



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46515 (13) U
(51) МПК
A61B 5/0275 (2009.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ СТАНУ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ БРОНХІВ У ДІТЕЙ МОЛОДШОГО ВІКУ З РЕЦИДИВУЮЧИМ БРОНХІТОМ В ПЕРІОД РЕМІСІЇ

1

2

(21) u200906891

(22) 01.07.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) КІНАШ ЮЛІЯ МИХАЙЛІВНА, КРЮЧКО ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ГАСЮК АНАТОЛІЙ ПЕТРОВИЧ

(73) КІНАШ ЮЛІЯ МИХАЙЛІВНА, КРЮЧКО ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА, ГАСЮК АНАТОЛІЙ ПЕТРОВИЧ

(57) Спосіб діагностики стану слизової оболонки бронхів у дітей молодшого віку з рецидивуючим бронхітом в період ремісії, що включає отримання досліджуваного матеріалу, дослідження мазків з подальшим вивченням стану миготливого епітелію та наявності запальної реакції слизової оболонки бронхів, який відрізняється тим, що використовують малоінвазивний метод забору харкотиння з наступним морфохімічним дослідженням

отриманого матеріалу шляхом додаткового використання спеціальних патохімічних методик забарвлення в декілька етапів: I - забарвлення за Папенгеймом, II - НСТ- та ЛКБ-тест, III етап - забарвлення амідочорним, і при зниженні співвідношення миготливих клітин до бокалоподібних (4:1 до 2:1), порушенні цілісності мембрани миготливих клітин та переважанні стадії секреції у бокалоподібних клітинах, наявності більше 70% дистрофічно змінених клітин, присутності лейкоцитів (до 15-20 в полі зору), бактерій, макрофагів (7-8 в полі зору) та плазматичних клітин діагностують запальну реакцію на слизовій бронхів (ендобронхіт), а переважання макрофагів, нейтрофілів в стадії цитокінезу та утворення гнійних тілець зі зниженими показниками НСТ- (до 3%) та ЛКБ-тестів (до 30%) є ознакою в'ялості фагоцитозу та виснаження захисних механізмів в бронхах.

Запропонований винахід відноситься до галузі медицини, а саме до педіатрії.

Значна поширеність рецидивуючого бронхіту, маніфестація перших проявів хвороби в ранньому дитинстві, протиріччя у діагностиці та лікуванні, рання трансформація у хронічний бронхіт або бронхіальну астму надає вивченню формуванню і профілактиці розвитку цього захворювання у дітей великого медико-соціального значення. Основна група дітей, що хворіють на рецидивуючий бронхіт, - це діти молодшого віку, тому перед сучасною медициною постає завдання ранньої діагностики патологічних змін в слизовій оболонці бронхів з використанням малоінвазивних методів, що дозволить своєчасно призначити адекватне лікування та попередити хронічні процеси. Перераховані проблеми, а також значна кількість діагностичних методів, які знаходяться сьогодні в арсеналі лікаря, ставлять педіатрів перед нелегким вибором оптимального варіанту діагностики.

Відомі способи діагностики патологічних змін в слизовій оболонці дихальних шляхів [Марушко Ю.В. Профілактика та терапія частих і рецидивних

респіраторних захворювань у дітей - актуальна проблема педіатрії. // Современная педиатрия. - 2006. - 2 (11). - С.32-36.; Сучасні підходи до діагностики, профілактики рецидивуючих і хронічних бронхітів у дітей / Ю.Г. Антипкін, Л.П. Арабська, О.А. Смірнова та ін. - К., 2003. - 124с.; Єфанова А.О. Клініко-імунологічні та цитобронхологічні особливості рецидивуючих і хронічних бронхітів у дітей. Прогноз та профілактика: Автореф. дис. на здоб. наук. ступеня канд. мед. наук / А.О. Єфанова. - Харків. - 2001.].

Найбільш близьким до запропонованого є спосіб діагностики стану слизової оболонки бронхів у дітей молодшого віку з рецидивуючим бронхітом в період ремісії із використанням бронхоскопії та цитоморфологічного дослідження мазків зі слизової оболонки бронхіального дерева (браш-біопсія) з подальшим визначенням наявності запальної реакції та стану епітелію слизової бронхів під електронним мікроскопом. [Сучасні підходи до діагностики, профілактики рецидивуючих і хронічних бронхітів у дітей / Ю.Г. Антипкін, Л.П. Арабська, О.А. Смірнова та ін. - К., 2003. - 124 с.]

(13) U

(11) 46515

(19) UA

Проте, даний спосіб має ряд недоліків, які обумовлені складністю виконання, високою інвазивністю, небезпечною ймовірністю летальних випадків при проведенні бронхоскопії та досить високою вартістю проведення електронної мікроскопії. Все це не дає змоги широко використовувати бронхоскопію та електронну мікроскопію для визначення стану слизової оболонки бронхів.

В основу винаходу поставлена задача створити спосіб діагностики стану слизової оболонки бронхів у дітей молодшого віку з рецидивуючим бронхітом в період ремісії, удосконаленням відомого, а саме заміною бронхоскопії на малоінвазивний метод забору харкотиння шляхом його індукції з наступним морфо-цитохімічним дослідженням отриманого матеріалу, досягти високої безпечності та інформативності оцінки стану слизової оболонки бронхів у даного контингенту хворих.

Поставлену задачу вирішують створенням способу діагностики стану слизової оболонки бронхів у дітей молодшого віку з рецидивуючим бронхітом в період ремісії, що включає отримання досліджуваного матеріалу, дослідження мазків з подальшим вивченням стану миготливого епітелію та наявності запальної реакції слизової оболонки бронхів, який відрізняється тим, що використовують малоінвазивний метод забору харкотиння з наступним морфо-цитохімічним дослідженням отриманого матеріалу шляхом додаткового використання спеціальних патогістохімічних методик забарвлення в декілька етапів: I - забарвлення за Папенгеймом, II - НСТ - та ЛКБ-тест, III етап - забарвлення амідочорним і при зниженні співвідношення миготливих клітин до бокалоподібних (4:1 до 2:1), порушенні цілісності мембрани миготливих клітин та переважання стадії секреції у бокалоподібних клітинах, наявності більше 70% дистрофічно змінених клітин, присутності лейкоцитів (до 15-20 в полі зору), бактерій, макрофагів (7-8 в полі зору) та плазматичних клітин діагностують запальну реакцію на слизовій бронхів (ендобронхіт), а переважання макрофагів, нейтрофілів в стадії цитокінезу та утворення гнійних тілець зі зниженими показниками НСТ - (до 3%) та ЛКБ-тестів (до 30%) є ознакою в'ялості фагоцитозу та виснаження захисних механізмів в бронхах.

Запропонований спосіб здійснюють наступним чином, проводили інгаляцію препарату β-агоністів (венталін) після чого через 15 хвилин здійснювали індукцію харкотиння інгаляцією 0,9% розчину натрію хлориду через небулайзер протягом 15-20 хвилин, що дозволяє отримати харкотиння у дитини будь-якого віку. З отриманого харкотиння готувалися 4 серії мазків-відбитків, 1 - фарбувалася по способу Папенгейма (азур-еозином), 2 - нітросинім тетразолам, 3 - ЛКБ-тест та 4 - амідочорним і за допомогою імерсійного збільшення ($\times 1000$) світлового мікроскопу "Olympus" C 3040-ADU проводилось цитологічне та цитогістохімічне дослідження епітеліальних клітин, макрофагів та нейтрофілів, наявних у харкотинні. З метою одержання об'єктивного тесту, нами на мазках-відбитках вивчалось не менше 5 полів зору. При цьому визначався НСТ-тест та ЛКБ-тест у процентному співвідношенні, стадії морфо-функціонального стану мак-

рофагів та нейтрофілів: стадія спокою, стадія адгезії, цитокінезу (формування цитоплазматичних псевдоподій) та стадія руйнування цитоплазми та ядра лейкоцита з утворенням гнійних тілець. Патологічні зміни в індукованому харкотинні оцінювали за наступною шкалою (Табл.1).

Таблиця 1

Шкала	Ознака
++++	сильно виражена
+++	виражена
++	помірно виражена
+	слабо виражена
-	відсутня

Запропонована методика забарвлення дає можливість визначити 3 типи мазка індукованого харкотиння. Так, в мазках-відбитках I типу спостерігається нормальне співвідношення миготливих та бокалоподібних клітин (5:1), переважають в харкотинні макрофаги в стадії спокою з високими показниками ЛКБ-тесту (70%) та негативним НСТ-тестом, що свідчить про спокійний стан клітин та відсутність запальної реакції. Присутність одиничних макрофагів вказує на правильність проведеного дослідження, тобто матеріал одержано з нижніх відділів бронхів.

Виявлені патологічні зміни в II типу мазків-відбитків відповідають морфологічним ознакам катарального ендобронхіту, про що свідчить початок порушення нормального співвідношення клітин миготливого епітелію, з підвищенням секреції бокалоподібних клітин. Переважання лейкоцитів та макрофагів в стадії адгезії та цитокінезу є діагностичним маркером фази розрешення запального процесу та збереженої фагоцитарної здатності лейкоцитів. Даний висновок підтверджують дані НСТ- (16-20%) та ЛКБ-тестів (40%). Враховуючи, що НСТ-тест свідчить про активацію лізосомальних протеолітичних ферментів, можна дійти висновку, що саме завдяки цим ферментам відбувається фагоцитарне розщеплення мікробів по мірі посилення адгезії до мікробного фактору НСТ - тест значно виражений. А зниження ЛКБ-тесту до 40% свідчить про фазу розрешення запального процесу, наявність не живих бактерій в лейкоцитах, що забарвилися в зелений колір є сприятливою ознакою завершеності фагоцитозу.

Патологічні зміни в мазках III типу відповідали стадії мукоїдизації ендобронхіту з початковими проявами перибронхіту, тобто при цій формі наявним було порушення структури бронхіального епітелію і виявлялися ознаки початку плоскоклітинної метаблазії. Переважання стадії цитокінезу та утворення гнійних тілець, зниження ЛКБ-тесту до 31% та наявність окремих гранулоцитів з фагоцитованими живими бактеріями всередині свідчили про присутність протеолітичних ферментів поза клітинами, незавершеність фагоцитозу та зниження рівня неспецифічної резистентності. Про виснаження захисних механізмів в слизовій оболонці бронхів свідчить різке зниження НСТ-тесту до 3%, тобто разом з деструкцією лейкоцитів та макрофагів їхні протеолітичні ферменти здійсню-

вали пошкоджуючий вплив на оточуючі тканини.

Приклад конкретного виконання.

Хворий Найко В.М., 3 роки, мешкає у Полтавській області, м. Гадяч, вул. Шевченка 38, кв. 62; перебував на стаціонарному лікуванні в алергологічному відділенні, імунологічне ліжко, Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні з 09.01.08 по 23.01.08 р. з приводу рецидивуючого бронхіту, період ремісії. Дитина поступила зі скаргами на часті ГРВІ, що ускладнюються бронхітами. З анамнезу відомо, що часто хворіти (7 разів на рік) почав з 6 місячного віку, після перенесеної ГРВІ, 3 рази на рік мав загострення рецидивуючого бронхіту, що тривали, в середньому, 2 тижні. При обстеженні супутньої соматичної патології не виявлено, із носоглотки висівався *Staphylococcus aureus*, при імунологічному обстеженні виявлений дефіцит фагоцитарної ланки імунної системи (фагоцитарне число - 3,7, фагоцитарний показник 38%), зниження активності показників клітинного та гуморального імунітету (CD3+ - 28%, CD4+ - 16%, CD8+ - 9%, CD20+ - 14%, IgA - 0,55г/л), незначне підвищення НСТ тесту (16%), дисбаланс в системі цитокинів (підвищення ІЛ-2 до 12,9пг/мл проти 8,75-11,19пг/мл у здорових дітей, ІЛ-5 до 37,5пг/мл проти 24,05-32,35пг/мл, ІЛ-12 до 450,9пг/мл проти 142,3-186,7пг/мл, зниження рівня γ-ІНФ до 3,3пг/мл проти 87,2-106,6пг/мл, рівень ІЛ-10 (45,2пг/мл) залишався в межах показників здорових дітей (36,8-68,6пг/мл відповідно), пригнічення активності показників місцевого імунітету слизових дихальних шляхів (slgA - 76мг/л проти 264,5-335,5мг/л у здорових дітей та лактоферину - 416нг/мл проти 4017,4-6772,6нг/мл відповідно).

З метою уточнення стану миготливого епітелію та фази запального процесу на слизовій бронхів дитині було призначено індукцію харкотиння через 15 хвилин після інгаляції венталіну проводилась інгаляція 0,9% розчину натрію хлориду через небулайзер протягом 15-20 хвилин, отримано 2мл слизового, прозорого та в'язкого харкотиння. З отриманого харкотиння готувалися 4 серії мазків-відбитків, 1 - фарбувалась по способу Папенгейма

(азур-еозином), 2 - нітросинім тетразолам (НСТ-тест), 3 - ЛКБ-тест, 4 - амідочорним та за допомогою імерсійного збільшення (×1000) світлового мікроскопу "Olimpus" С 3040-ADU проводилось цитологічне та цитогістохімічне дослідження стану епітеліальних клітин, макрофагів та нейтрофілів, наявних у харкотинні.

В мазках харкотиння визначалася велика кількість епітеліальних клітин, співвідношення бокалоподібних клітин до миготливих було значно знижене і складало 1:2. При забарвленні амідочорним зустрічалися миготливі клітини з порушенням цілісності мембрани на апікальній частині клітин. Бокалоподібні клітини з великими світлими слизистими гранулами. Поряд зі стадією гіперсекреції у бокалоподібних клітинах, також визначалась їх дегенерація та зменшення секреторних гранул. Практично у всіх мазках визначалося близько 78% дистрофічно змінених клітин. Крім епітеліальних клітин в мазках індукованого харкотиння, також присутніми були лейкоцити до 15-20 в полі зору, бактерії, підвищена кількість макрофагів (7-8 в полі зору) та 5-6 плазматичних клітин переважно великих, що синтезують slgA.

Слід відзначити, що на цитологічних препаратах в різних полях зору виявляються переважно ті чи інші морфо-функціональні стани лейкоцитів або макрофагів (табл.2). Встановлено, що в стадії спокою ці клітини характеризуються чітко вираженими контурами як цитоплазми, так і ядра. Підтвердженням положення того, що різні форми лейкоцитів знаходяться у стані спокою, являються результати гістохімічної реакції на НСТ - тест та ЛКБ-тест. Встановлено, що цитоплазма лейкоцитів не містить активованих лізосом у вигляді темно-фіолетових гранул та містить високий процент катіонних білків.

Друга стадія запального процесу (адгезивна) характеризується властивістю лейкоцитів та макрофагів при гістохімічному забарвленні амідочорним деякою конденсацією гетерохроматину ядер, проте цитоплазма має гладкі зовнішні контури.

Таблиця 2

Морфо-функціональний стан лейкоцитів та макрофагів наявних в індукованому харкотинні обстеженої дитини

Показник	НСТ-тест (%)	ЛКБ-тест (%)	Стадії запального процесу				Бактерії
			спокою	адгезії	цитокінезу	Утворення гнійних тілець	
Дані хворого	3	31	+	+	++	+	+

Третя стадія морфо-функціонального стану лейкоцитів проявляється формуванням цитоплазматичних відростків у вигляді псевдоподій. При забарвленні азур-еозином за методом Папенгейма дана фаза характеризується крайовим розташуванням сегментів ядер по відношенню до цитоплазми з конденсацією хроматину. Найбільш інформативні показники фагоцитозу лейкоцитів нами отримані при забарвленні амідочорним. Встановлено, що в III фазу запального процесу

визначаються лейкоцити у яких поряд із розпадом гетерохроматину ядра на окремі глибки, входженням останнього гетерохроматину в цитоплазматичні відростки (псевдоподії). Вказані морфологічні структури мають радіальне розгалуження відносно центра клітини і нагадують "голкі їжачка".

IV фаза морфо-функціонального стану лейкоцитів характеризується наявністю гнійних тілець. Останні характеризуються різними стадіями часткового або повного зруйнування лейкоцитів. Саме

завдяки процесу зруйнування ядер та цитоплазми, утворюються так звані гнійні тільця. Останні, маючи високу протеолітичну активність ферментів, зумовлюють не тільки зруйнування мікробів, а й навколишньої тканини.

Патологічні зміни в індукованому харкотинні даної дитини відповідали III типу мазка, тобто мала місце стадія мукоїдизації ендобронхіту з початковими проявами перибронхіту, тобто при цій формі виявлялися порушення структури бронхіального епітелію та ознаки початку плоскоклітинної метаплазії. Необхідно зазначити, що у мазках даної дитини переважали стадії цитокінезу та утворення гнійних тілець. Зниження ЛКБ-тесту та НСТ-тесту (табл.2) свідчить про виснаження захисних механізмів в слизовій оболонці бронхів.

Таким чином, можна зробити висновок, що у хворого з рецидивуючим бронхітом в період клінічної ремісії спостерігається запальна реакція на слизовій бронхів, наявність незавершеного фагоцитозу в поєднанні з недостатністю місцевого імунітету слизових сприяє хронічному запальному процесу і хворий потребує більш тривалого, патогенетично обумовленого реабілітаційного лікування.

Запропонованим способом в умовах алергологічного відділення Полтавської обласної дитячої клінічної лікарні було обстежено 34 дитини з рецидивуючим бронхітом у стадії ремісії. Доцільність запропонованого методу обумовлена високою доступністю, малоінвазивністю, безпечністю та досить нескладним виконанням, що дозволяє визначати стан миготливого епітелію та фазу запального процесу в слизовій бронхів. Застосування даного діагностичного методу дає можливість індивідуально для кожної дитини розробити комплекс реабілітаційних заходів залежно від ступеня деструктивних змін та фази запального процесу на слизовій оболонці бронхів та диференційовано підійти до призначення імуномодуючих та антибактеріальних препаратів. Проведені нами дослідження патогенетично обґрунтовують тривалість відновного лікування при рецидивуючому бронхіті у дітей.

Впровадження даного способу діагностики дозволило підвищити ефективність комплексної реабілітації рецидивуючого бронхіту у дітей в період ремісії захворювання, зменшити частоту та тривалість виникнення загострень, що позитивно позначилося на показниках якості життя хворих дітей.