

УДК [211::284-002]616

DOI: 10.14427/jipai.2015.3.25

Особенности функционирования фагоцитарного звена иммунитета у детей с аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом

Е.Н. Кологривова^{1,2}, Р.И. Плешко^{1,2}, Н.В. Щербик^{1,2}, А.В. Староха^{1,2}

1Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия; 2Томский филиал ФГБУ «Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА», Томск, Россия

The features of phagocytes functions in children with adenoiditis and otitis media with effusion

E.N. Kologrivova^{1,2}, R.I. Pleshko^{1,2}, N.V. Sherbik, A.V. Starocha^{1,2}

1Siberian State Medical University, Tomsk, Russia; 2Tomsk branch FSBI "Scientific-clinical center of otorhinolaryngology FMBA", Tomsk, Russia

Аннотация

В основе развития хронических заболеваний верхних дыхательных путей лежит недостаточность иммунной защиты, в том числе – нарушения в системе врожденного иммунитета. Целью исследования явилось изучение особенностей функционирования фагоцитарного звена иммунитета у детей с хроническим аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом. Показано, что у всех детей с хроническим аденоидитом на мазках-отпечатках со слизистой носа резко снижено относительное содержание нейтрофильных лейкоцитов. При наличии экссудативного среднего отита у детей с хроническим аденоидитом в составе риноцитограмм отмечено повышение относительного количества макрофагов, угнетение локальной продукции интерлейкинов 8 и 18, в большом проценте образцов назального секрета выявлялся γ -интерферон. В глоточной миндалине у детей с отитом выявлено повышение численности внутрифолликулярных CD68⁺-клеток. Результаты исследования свидетельствуют о повышенной активации клеток макрофагального ряда при распространении воспалительного процесса со слизистой оболочки носоглотки в полость среднего уха у больных хроническим аденоидитом и являются патогенетическим обоснованием использования иммунотерапии, направленной на коррекцию функций фагоцитов, для повышения эффективности лечения хронического аденоидита и профилактики его осложнений.

Ключевые слова

Нейтрофилы, макрофаги, слизистая оболочка носоглотки, хроническое воспаление

Summary

Immunodeficiency including innate immunity abnormalities lies at the heart of the chronic diseases of the upper airways. The purpose of this study was to determine the features of phagocytes functions in children with adenoiditis and otitis media with effusion. The fraction of neutrophils was significantly reduced in smears of all patients. Increasing of the fraction of macrophages, lowering of interleukin 8 and interleukin18 concentration, high percentage of interferon-gamma-positive samples was determined at patients with adenoiditis and otitis media with effusion. Expression of the intrafollicular CD68⁺ cells was significantly higher in adenoids from children with adenoiditis and otitis media. These results illustrate the enhanced activation of macrophages when inflammation extended from nasopharynx to middle ear in patients with adenoiditis. This serves as an additional justification for the appointment of the immune therapy aiming correction of the macrophages functions to increase the efficacy of adenoiditis treatment and prevention of the aftereffects of illness.

Keywords

Neutrophil, macrophage, mucosa of nasopharynx, chronic inflammation

Введение

По данным ВОЗ около 70% заболеваний детского возраста приходится на болезни верхних дыхательных путей и среднего уха [1, 2]. В структуре заболеваний уха, горла, носа у детей дошкольного и младшего школьного возраста более 74% составляет патология глоточной миндалины - аденоидит, одним из наиболее частых и тяжелых осложнений которого является экссудативный средний отит (ЭСО) [3]. ЭСО трудно поддается лечению, приводит к развитию тугоухости и инвалидизации [4].

Среди причин развития рецидивирующих инфекций верхних дыхательных путей может лежать недостаточность иммунологической защиты, ключевую роль в которой в детском возрасте выполняют факторы врожденного иммунитета [5, 6, 7].

Врожденный иммунитет – это часть иммунной системы, которая обеспечивает немедленную защиту в форме воспалительной реакции, активирует реакции адаптивного иммунитета и контролирует их развитие и качество [8].

Центральное место в системе врожденного иммунитета занимает фагоцитарное звено, включающее нейтрофилы и макрофаги, во многом определяющее течение и эффективность воспалительного процесса. Успешный результат вовлечения определенных клеточных популяций в зону воспаления зависит от спектра синтезируемых локально хемокинов, от экспрессии соответствующих рецепторов на лейкоцитах и от функциональной «зрелости» рекрутированных клеток [7, 9, 10].

Целью нашего исследования явилось изучение особенностей функционирования фагоцитарного звена иммунитета у детей с хроническим аденоидитом, осложненным и не осложненным экссудативным средним отитом.

Материалы и методы

Обследованы 72 ребенка в возрасте от 3 до 7 лет, поступивших на хирургическое лечение для планового оперативного вмешательства (аденотомия и шунтирование барабанной полости). Были сформированы две клинические группы: 1-я - дети, страдающие хроническим аденоидитом (ХА), не осложненным экссудативным средним отитом (ЭСО) (n=39); 2-я – дети с ХА, ассоциированным с ЭСО (n=33). Пациенты обследованы в состоянии клинической ремиссии. Контрольную группу составили относительно здоровые дети, без воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей и без отягощенного

аллергического анамнеза (16 человек). Все исследования были одобрены локальным этическим комитетом.

Материалами исследования стали мазки из носоглотки, назальный секрет и биоптаты глоточной миндалины, полученные в ходе аденотомии. Клеточный материал со слизистой носоглотки забирался стерильным ватным тампоном (у детей с аденоидитом - интраоперационно), распределялся на стекле и окрашивался азуром II и эозином. При цитологическом анализе производили морфологический учет относительного содержания (%) нейтрофилов, лимфоцитов, эозинофилов, макрофагов (МФ) по методу Матвеевой Л.А. и соавт. [11].

В назальном секрете методом иммуноферментного анализа с использованием наборов производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия) определяли концентрацию цитокинов, оказывающих существенное влияние на активность клеток фагоцитарного ряда: интерлейкина (IL)-8, IL-18, интерферона (IFN) γ . Назальный секрет получали после промывания ватного туффера, используемого для приготовления мазков со слизистой носа, в 2,0 мл физиологического раствора и его центрифугирования в течение 10 мин при 3000 об/мин. Надосадок замораживали при температуре -72°C до момента определения исследуемых параметров. Для стандартизации результатов иммуноферментного анализа в пробах назального секрета проводилось определение общего белка с использованием набора реагентов «Протеин-Ново» («Вектор-Бест», Новосибирск, Россия).

Гистологическое исследование глоточных миндалин проводилось на окрашенных гематоксилином и эозином срезах, при увеличении 40x10 (AxioVision, Carl Zeiss, Германия). Морфометрические исследования включали в себя количественный анализ микрофотографий, полученных с помощью цифровой фотокамеры Canon Power Shot A 630, с использованием программы ImageJ 1.43, а также подсчет количества макрофагов внутри фолликулов и в межфолликулярном пространстве в 10-15 полях зрения с перерасчетом на 1 мм² биоптата.

Иммуногистохимическое исследование срезов глоточной миндалины включало выявление и количественную оценку CD68+ клеток (Novocastra Laboratories, UK), в состав которых входят моноциты, тканевые макрофаги, дендритные клетки [12]. Осуществляли подсчет клеток со специфической окраской, локализующихся внутри- или межфолликулярно, в

15-20 полях зрения с последующим перерасчетом на 1мм^2 среза.

Для проведения статистической обработки фактического материала использовали статистический пакет «SPSS Statistica» версия 17.0 для Windows. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

Результаты

При анализе мазков со слизистой носа у здоровых детей было выявлено преобладание нейтрофилов (Табл.1), тогда как в мазках больных аденоидитом существенно доминировали лимфоциты. У детей с ХА, осложненным и не осложненным ЭСО, количество нейтрофилов было статистически значимо снижено относительно группы здоровых, при этом между двумя клиническими группами достоверных различий обнаружено не было (Табл.1).

Клетки макрофагального ряда в мазках со слизистой носа встречались в единичном коли-

честве, но их число было статистически значимо больше у детей, болеющих ХА, ассоциированным с ЭСО, в сравнении с группой здоровых детей ($p=0,049$).

Анализ концентрации IL-8 в назальных смывах показал, что у всех детей, больных хроническим аденоидитом, его содержание снижено по сравнению с контрольной группой, однако статистически значимое различие ($p=0,001$) выявлено только для группы детей, имеющих сочетанную патологию (Табл. 2). Следует отметить, что концентрация IL-8 в этой клинической группе значимо отличалась и от значения этого параметра у детей с не осложненным течением ХА ($p=0,005$).

Максимальная концентрация IL-18 определялась в назальном смыве у больных с не осложненным течением хронического аденоидита (Табл.2). Минимальное значение этого цитокина зарегистрировано в группе детей с сочетанной патологией, причем концентрация IL-18 у этих больных была в 4 раза снижена по сравнению со

Таблица 1. Риноцитогамма у детей с аденоидитом, % (Ме ($Q_{25} - Q_{75}$))

Параметры/ группы исследования	Контроль (n=16)	Аденоидит (n=37)	Аденоидит и экссудативный отит (n=33)	P
Макрофаги	0,5 (0 – 1,5)	0 (0 – 4)	3(0–9)	$p_{1/3}=0,049$
Нейтрофилы	62 (40,25– 83)	10 (2 – 28)	22(3–41)	$p_{1/2} < 0,001$ $p_{1/3}=0,001$
Лимфоциты	37,5 (16,25 – 56,25)	83 (58,5 – 96)	74 (47,5 – 90)	$p_{1/2} < 0,001$ $p_{1/3}=0,001$

Примечание: n – число обследованных в группе; p – уровень значимости различий; $p_{1/2}$ - уровень значимости различий между контрольной группой и группой с аденоидитом; $p_{1/3}$ – уровень значимости различий между контрольной группой и группой больных аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом.

Таблица 2. Концентрация IL-8, IL-18, IFN- γ в назальном секрете, пг/г белка/л, Ме($Q_{25} - Q_{75}$)

Параметры / исследуемые группы	Контроль (n=14)	Аденоидит (n=23)	Аденоидит и экссудативный средний отит (n=24)	P
IL-8	413,00 (283,00 – 472,00)	378,00 (229,50 – 444,00)	90,00 (91,50 – 250,00)	$p_{1/3} < 0,0001$ $p_{2/3} = 0,005$
IL-18	85,00 (80,00 – 262,00)	185,00 (91,08 – 271,55)	45,33 (35,00 – 55,50)	$p_{2/3} = 0,029$
IFN- γ	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1,2)	

Примечание: n – число обследованных в группе; p – уровень значимости различий; $p_{1/3}$ – уровень значимости различий между группой контроля и группой больных аденоидитом, осложненным экссудативным средним отитом; $p_{2/3}$ – уровень значимости различий между группами с аденоидитом, осложненным и не осложненным экссудативным средним отитом.

значениями, характеризующими больных ХА без ЭСО ($p=0,029$).

Различий между концентрациями $INF\gamma$ в сравниваемых группах, включая контрольную, выявлено не было (Табл. 2). Следует отметить, что значения медиан, характеризующих концентрацию $INF\gamma$, во всех обследованных группах были равны нулю. Однако мы отметили, что частота обнаружения этого цитокина в пробах назального смыва увеличивалась по мере прогрессирования заболевания. Если у детей контрольной группы $INF\gamma$ выявлялся лишь в единичных пробах (6,3%), то при не осложненном течении ХА этот цитокин определялся в 3 раза чаще - в 17% проб, а среди детей с аденоидитом, ассоциированным с ЭСО, $INF\gamma$ определялся еще чаще (30,4%), и статистическая обработка выявила тенденцию к повышению его концентрации в назальном смыве ($p=0,09$), по отношению к группе контроля.

При анализе гистологических особенностей глоточной миндалины особое внимание было уделено клеткам макрофагального ряда, которые в условиях хронического воспаления способны реализовать как эффекторную функцию (фагоцитоз), так и индуцировать развитие адаптивных иммунных реакций (в качестве антиген-представляющих клеток). Макрофаги отчетливо выявлялись в лимфоидной ткани аденоидов, представляя собой крупные широкоплазменные клетки с большими ядрами, чаще с признаками фагоцитоза. Макрофаги располагались преимущественно интрафолликулярно, в межфолликулярной зоне выявлялись единичные клеточные элементы с подобными морфологическими характеристиками. Морфометрические исследова-

ния показали, что для детей с сочетанной патологией была характерна более низкая плотность макрофагов в фолликулах аденоидов (Табл.3). В то же время иммуногистохимический анализ показал, что у таких пациентов количество $CD68+$ клеток в фолликулах была значимо выше ($p=0,005$). Следует отметить, что количество межфолликулярно расположенных макрофагов и $CD68+$ клеток не различалось в сравниваемых группах и было существенно ниже, по сравнению с числом внутрифолликулярно расположенных клеток (Табл.3).

Обсуждение

Известно, что у здоровых людей большую часть клеток в назофарингиальных смывах составляют нейтрофильные лейкоциты [8]. Эмигрирующие на поверхность слизистых нейтрофилы в дальнейшем подвергаются осмотическому лизису с последующим высвобождением внутриклеточного содержимого, внося существенный вклад в создание антимикробного потенциала секреторных жидкостей. Более того, доказано постоянное присутствие нейтрофильных лейкоцитов в миндалинах лимфоглоточного кольца. Так, A.Ebenfelt and M.Ivarsson (2001) сообщают о том, что кластеры нейтрофилов присутствуют в эпителии небных миндалин как у здоровых индивидов, так и у больных хроническим тонзиллитом [7]. Согласно результатам исследования V.Huard et al. (2008), воспалительно-рекрутированные нейтрофилы поддерживают локальную продукцию антител в мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани посредством секреции цитокина APRIL (лиганд, индуцирующий пролиферацию) [13].

Таблица 3. Гистологические и иммуногистохимические параметры глоточной миндалины (Ме (Q25 – Q75)), в 1 мм²

Параметры / исследуемые группы	Аденоидит (n=10)	Аденоидит и экссудативный средний отит (n=10)	P
Макрофаги, внутрифолликулярно	12,5 (7,0-19,0)	4,0 (0,0-15,0)	$p=0,039$
Макрофаги, межфолликулярно	1,5 (0,0-6,5)	0,0 (0,0-4,0)	$p=0,606$
$CD68+$, внутрифолликулярно	328,0 (263,0 - 409,0)	475,0 (420,0 - 562,0)	$p=0,005$
$CD68+$, межфолликулярно	163,0 (94,0 - 205,0)	137,5 (96,0 - 187,0)	$p=0,684$

Примечание: n – число обследованных в группе; p – уровень значимости различий между группами с аденоидитом, осложненным и не осложненным экссудативным средним отитом.

Снижение количества нейтрофилов на слизистых оболочках при хронических заболеваниях верхних дыхательных путей было зафиксировано многими авторами [5]. Выявленное нами уменьшение численности нейтрофилов в составе риноцитограмм у детей с ХА согласуется с этими данными, и может быть связано с изменениями локальной продукции цитокинов, регулирующих миграционную активность клеток. Доказательством является выявленная нами ассоциация низкой концентрации IL-8 в назальном смыве и числа нейтрофилов на слизистой носа у больных с сочетанием хронического аденоидита и ЭСО. Этот цитокин относится к группе хемокинов, обеспечивающих хемотаксис в зону воспаления различных типов клеток: прежде всего - нейтрофилов, а также моноцитов, эозинофилов, Т-клеток [14]. IL-8 обладает выраженными провоспалительными свойствами, вызывает экспрессию молекул межклеточной адгезии и усиливает прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам, что свидетельствует о его основной роли в опосредовании воспалительного ответа [15]. В исследованиях *in vitro* показано, что продуцентами IL-8 могут быть эпителиоциты, назальные фибробласты и сами нейтрофилы [14].

Имеются данные о более существенном снижении концентрации IL-8 в носоглоточных смывах у детей с хроническим аденоидитом, протекающим на фоне гипертрофии глоточной миндалины [9].

Наряду с изменениями, отражающими нарушение защиты со стороны нейтрофилов, мы выявили признаки изменения функциональной активности клеток макрофагального звена врожденного иммунитета. Следует отметить, что статистически значимые отличия от значений параметров здоровых детей были зарегистрированы только у больных с осложненным течением хронического аденоидита. Повышение относительного количества макрофагов в мазках со слизистой носоглотки у этих пациентов сочеталось с низким содержанием IL-18 и высокой частотой выявления IFN- γ в назальном смыве, а также с низкой численностью морфологически идентифицированных макрофагов и увеличением количества CD68-позитивных клеток в фолликулах глоточной миндалины.

IL-18 продуцируется в основном макрофагами и дендритными клетками. Являясь плеiotропным провоспалительным цитокином, IL-18 стимулирует продукцию IFN γ , TNF α , IL-1, IL-2, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , молекул адгезии и факторов

апоптоза, активирует макрофаги и нейтрофилы, увеличивает пролиферативную активность Т-лимфоцитов, повышает литическую активность NK-клеток [16]. В недавних исследованиях показано, что нейтрофилы, стимулированные липополисахаридами клеточной стенки бактерий, также способны секретировать IL-18 [17]. Вышеперечисленные эффекты этого цитокина позволяют рассматривать его как один из ключевых факторов противоинфекционной защиты организма. Снижение его концентрации в назальном смыве у детей на фоне хронического аденоидита, ассоциированного с ЭСО, может свидетельствовать о нарушении контроля за течением воспалительного процесса на слизистой носоглотки.

IFN γ является одним из важнейших кофакторов, направляющих дифференцировку CD4+ лимфоцитов в Т-хелперы 1-го типа (Th1), которые, в свою очередь, становятся продуцентами этого цитокина. Наряду с Т-лимфоцитами, IFN γ секретируется активированными макрофагами и натуральными киллерами, оказывая на них аутокринное стимулирующее воздействие. Макрофаги, активированные под влиянием IFN γ (так называемые классические воспалительные M1-макрофаги), приобретают способность к продукции целого ряда провоспалительных медиаторов (IL-1, 6, 12, TNF α), к реализации цитотоксичности за счет продукции кислородных радикалов и оксида азота, а также к усилению экспрессии HLA II класса и антигенпрезентирующей активности [18].

Вполне вероятно, что разнонаправленные изменения в численности морфологически идентифицированных макрофагов и CD68+ клеток обусловлены влиянием локально продуцируемого IFN γ . Кроме того, сравнительно недавно показано, что молекула CD68 экспрессируется не только на моноцитах/макрофагах, а также на вновь рекрутированных нейтрофилах [12] и на клетках не миелоидного происхождения, таких как Т-лимфоциты, фибробласты [19].

По-видимому, в условиях сохранной способности клеток к продукции регулирующих функции нейтрофилов и макрофагов цитокинов, в том числе IL-8 и IL-18 (не осложненная форма хронического аденоидита), обеспечивается возможность реализации фагоцитарных эффекторных реакций, и, по крайней мере, зона хронического воспаления ограничивается лимфоэпителиальными структурами (глоточная миндалина). Нарушения в системе межклеточных взаимодействий приводят к несостоятельности реакций

врожденного иммунитета и к индукции макрофагально-опосредованного иммунного воспаления, с активацией, прежде всего, Т-клеточных иммунных реакций, обладающих высоким цитодеструктивным потенциалом, и способствующих распространению воспалительного процесса. Как следует из наших результатов, реализация этого патогенетического механизма наблюдается у детей с ХА, ассоциированным с ЭСО, что совпадает с результатами Matkovic S. et al [20].

Заключение

Таким образом, наше исследование подтвердило чрезвычайно важную роль фагоцитарного звена врожденного иммунитета в реализации

защитных реакций на слизистой оболочке носоглотки. Показано, что в патогенезе экссудативного среднего отита, сформировавшегося у детей с хроническим аденоидитом, существенное значение имеет нарушение локальной продукции цитокинов, контролирующих функциональную активность нейтрофилов и макрофагов (IL-8, IL-18, IFN γ). Полученные результаты являются дополнительным патогенетическим обоснованием целесообразности использования иммуномодулирующей терапии, направленной на коррекцию функциональной активности фагоцитов, в целях повышения эффективности лечения хронического аденоидита и профилактики его осложнений.

Литература

1. Богомильский М.Р., Гаращенко Т.И., Елагина И.Е. Распространенность патологии лимфоузлов у детей московского региона. Педиатрия. 2004; 6: 97-101.
2. Сутулова С.Г., Ильенко Л.И., Гаращенко Т.И. Антигомотоксическая терапия в профилактике заболеваний лимфоузлов у детей. Детские инфекции. 2005; 3: 67-70.
3. Агаджанова С.Н., Цветков Э.А. Особенности физического и психического развития детей, страдающих аденоидитом. Новости оториноларингологии и логопатологии. 2002; 2 (30): 3-7.
4. Оториноларингология: национальное руководство/под ред. Пальчуна В. Т. М.:ГЭОТАР-Медиа, 2009.
5. Зорина В.Н., Климова И.И., Вышлова А.С. и соавт. Некоторые аспекты патогенетических механизмов гипертрофии и воспаления глоточной миндалины у детей. Медицинская иммунология. 2010. 4-5: 441-446.
6. Хмельницкая Н.М., Ланцов А.А. Клинико-морфологическая оценка функционального состояния небных миндалин при клинических проявлениях хронического тонзиллита. Вестник оториноларингологии. 1998; 5: 38-39.
7. Ebenfelt A. Ivarsson M. Neutrophil migration in tonsils. J Anat 2001; 198: 497-500.
8. van Drunen CM, Mjösberg JM, Segboer CL et al. Role of innate immunity in the pathogenesis of chronic rhinosinusitis: progress and new avenues. Curr Allergy Asthma Rep. 2012 Apr; 12 (2):120-6.
9. Кузнецова Р.Н., Сысоев К.А., Лебедев В.В. и соавт. Цитокины в носоглоточных смывах больных с хроническим аденоидитом в ходе местной монотерапии иммунофаном. Медицинская иммунология. 2008; 2-3: 261-268.
10. Швыдченко И.Н. Нейтрофильные гранулоциты как источник цитокинов семейства интерлейкина 1. Цитокины и воспаление. 2012; 1: 17-25.
11. Матвеева Л. А., Местный иммунитет при болезнях легких у детей. Томск: Изд-во Том. ун – та, 1986.
12. Amanzada A, Ahmed Malik A, Blaschke M et al. Identification of CD68+ neutrophil granulocytes in in vitro model of acute inflammation and inflammatory bowel disease Int J Clin Exp Pathol. 2013; 6(4): 561-70.
13. Huard B, McKee T, Bosshard C et al. APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. J Clin Invest. 2008;118(8):2887-95.
14. Rudack C, Maune S, Eble J, Schroeder JM. The primary role in biologic activity of the neutrophil chemokines IL-8 and GRO-alpha in cultured nasal epithelial cells. J Interferon Cytokine Res 2003; 23:113-23.
15. Rudack C., Jörg S., Sachse F. Neutrophil chemokines in tonsillitis Clin Exp Immunol 2004; 135:511-518.
16. Nakanishi, K., T. Yoshimoto, H. Tsutsui, H. Okamura. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. Annu Rev Immunol. 2001; 19: 423-74.
17. Fortin CF, Ear T, McDonald PP. Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammation cytokine generation by human neutrophils. FASEB J. 2009 Jan; 23(1):194-203.
18. Muraille E., Leo O., Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? Front Immunol. 2014 Nov 26; 5: 603.
19. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. Scand J Immunol. 2008; 67:453-63.
20. Matković S., Vojvodić D., Baljosevic I. Cytokine levels in groups of patients with different duration of chronic secretory otitis. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2007; 264(11): 1283-1287.

Сведения об авторах:

Кологривова Е.Н. 634049, г.Томск, ул.Рабочая, 45, кв.70. 8-913-876-80-69, enkolgrivova@mail.ru

Поступила 8.09.2015 г.