

УДК 616-003.218:616.234-002-076.5

БАЗАЛЬНЫЙ ТРАХЕОБРОНХИАЛЬНЫЙ СЕКРЕТ: НЕИНВАЗИВНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ, СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РЕСПИРАТОРНОЙ СИСТЕМЫ

В.А. Добрых¹, И.Е. Мун¹, Е.В. Медведева¹, О.А. Ковалева², Е.А. Фролова³

¹Дальневосточный государственный медицинский университет (670000 г. Хабаровск, ул. Муравьева-Амурского, 35),

²301-й окружной военный клинический госпиталь (680000 г. Хабаровск, ул. Серышева, 1),

³Клинический центр восстановительной медицины и реабилитации (680000 г. Хабаровск, ул. Запарина, 76)

Ключевые слова: фарингеальная ловушка, базальный трахеобронхиальный секрет, цитоморфология.

Описание клинических испытаний устройства для неинвазивного получения образцов базального трахеобронхиального секрета (БТС) – фарингеальной ловушки. Сопоставлены цитоморфологические характеристики БТС у здоровых волонтеров и пациентов с острыми и хроническими заболеваниями респираторной системы. Показано, что клеточный состав получаемого субстрата и содержимое трахеобронхиального пространства практически идентичны. У женщин цитограммы различались в разные фазы менструального цикла, но гендерных различий не выявлено. При табакокурении, внебольничной пневмонии, острых респираторных заболеваниях, хроническом бронхите, хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астме выявлены характерные нозологические особенности цитоморфологических характеристик БТС. Предлагаемая технология рекомендует-ся к широкому использованию в клинической практике.

Исследование свойств содержимого нижних дыхательных путей сопряжено с серьезными методическими проблемами его получения и идентификации. Свойства спонтанной либо индуцированной мокроты, жидкости бронхоальвеолярного лаважа и даже образцов секрета, полученных во время бронхоскопии, недостаточно точно отражают характеристики базального трахеобронхиального секрета (БТС). Это связано с модулирующими влияниями плохо контролируемых факторов примешивания слюны и слизи носоглотки либо ятрогенными изменениями исходных свойств содержимого бронхов ингалируемыми осмотически активными веществами или самой процедурой бронхоскопии. Помимо этого, бронхоскопия и получение индуцированной мокроты сопряжены с рядом клинически значимых побочных явлений [1, 2, 9, 10].

Применяемая нами на протяжении нескольких лет технология неинвазивного получения образцов БТС с помощью оригинального устройства, названного фарингеальной ловушкой, позволила во многом избежать вышеназванных модулирующих влияний и получить ряд новых данных [4, 5].

В настоящей работе представлены технология использования модифицированной фарингеальной ловушки и сравнительные результаты исследования цитоморфологических свойств БТС у здоровых и лиц с заболеваниями респираторной системы.

Материал и методы. Фарингеальная ловушка, претерпевшая за годы использования ряд

усовершенствований, в последнем варианте представляет собой приспособление из двух металлических пластин, расположенных друг относительно друга под острым углом и соединенных между собой пружинящей рукояткой. Использование устройства осуществляется путем введения его рабочей части в ротовую полость пациента, выдвижением верхней пластины и установкой ее над входом в гортань. Обследуемый по сигналу производит 3–4 сильных кашлевых толчка в результате чего частицы БТС попадают на нижнюю поверхность верхней пластины (рис.), после чего устройство извлекается.

Необходимое для наших исследований количество материала (не менее 10–15 мм³) удавалось получить у большинства здоровых людей и больных с патологией респираторной системы. Вся процедура получения образцов занимает, как правило, несколько секунд.

Запатентованный вариант фарингеальной ловушки был награжден золотой и серебряной медалями на международной выставке-конгрессе «Высокие технологии. Инновации. Инвестиции» в Санкт-Петербурге в марте 2009 г. и на Московском международном салоне инноваций и инвестиций в августе 2009 г.

Полученный биосубстрат переносится на предметное стекло, стандартный мазок окрашивается традиционным методом May–Grunwald–Giemsa. Затем при увеличении в 1000 раз на бинокулярном светооптическом микроскопе квалифицированным

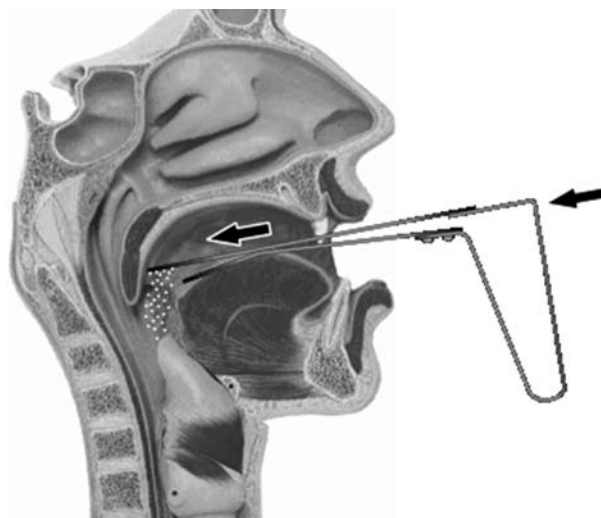


Рис. Схема использования фарингеальной ловушки.

врачом-лаборантом, не информированным о конкретных целях исследования, проводятся идентификация и подсчет клеточных элементов путем просмотра не менее 10 случайно выбранных полей зрения.

С целью расширенной клинической апробации метода были изучены в общей сложности морфологические свойства 13 319 клеток образцов БТС у 207 человек. Исследования выполнялись на базах 301-го окружного военного клинического госпиталя и Клинического центра восстановительного лечения и реабилитации г. Хабаровска в 2005–2009 гг. Изучался БТС 52 мужчин 18–24 лет с нетяжелой внебольничной пневмонией в период разгара заболевания (2–3-й день) и разрешения инфильтрации (12–13-й день). Также были обследованы 28 мужчин 23–46 лет с хроническим бронхитом вне обострения, 8 мужчин с хронической обструктивной болезнью легких I–II стадии вне обострения (средний возраст 56,1 г.) и 24 женщины с частично контролируемой бронхиальной астмой (средний возраст 41,4 г.). Диагностика перечисленных заболеваний проводилась в соответствии с существующими критериями [3, 6, 7]. Кроме того, БТС исследован у 12 мужчин и 12 женщин в возрасте 22–28 лет на 4–5-й день острого респираторного заболевания. Для контроля обследован 71 практически здоровый волонтер в возрасте 19–46 лет (включены курящие и некурящие).

Статистическая обработка данных проводилась посредством программ Biostat и Excel. Достоверность различий при нормальном распределении показателей в группах сравнения оценивали посредством критерия Стьюдента, другие сопоставляемые совокупности и доли выборок – с использованием непараметрических критериев (Манна-Уитни и Фишера). Выполнялся также расчет парных коэффициентов корреляции Пирсона и коэффициентов вариации.

Результаты исследования и обсуждение полученных данных. Выполненные на первом этапе исследования методического характера подтвердили обоснованность использования образцов БТС для оценки свойств содержимого трахеобронхиального дерева. Сопоставление цитологического состава БТС, полученного от здоровых некурящих волонтеров-мужчин, с цитологическим составом нормального содержимого бронхоальвеолярного пространства, указанным в рекомендациях Европейского респираторного общества, показало их идентичность. В обоих субстратах отмечено преобладание клеток мерцательного над клетками плоского эпителия (10–15:1), одинаковое содержание макрофагов (60–80 %) и нейтрофилов (5–20 %) [6].

Сопоставление цитологических характеристик мокроты и образцов БТС, взятых с помощью фарингеальной ловушки у больных внебольничной пневмонией в период разрешения инфильтрации, показало, что БТС значительно точнее отражало цитологические характеристики секрета бронхов. Так, клетки плоского эпителия составляли 1,2 и 27,7 %, а мерцательного эпителия – 23,1 и 11,4 % в образцах мокроты и БТС соответственно. Было установлено также, что клеточный

состав биоматериалов, полученных с поверхности слизистой оболочки задней стенки глотки и гортани, существенно отличался от состава БТС резким преобладанием клеток плоского эпителия. Таким образом, было доказано, что получаемый посредством фарингеальной ловушки биоматериал имеет преимущественно трахеобронхиальное происхождение.

Проведение расширенной клинической апробации метода у здоровых волонтеров обоего пола показало отсутствие гендерных различий по содержанию неэпителиальных клеток. Сравнительная оценка цитологических характеристик образцов в зависимости от фаз менструального цикла, выполненная у практически здоровых женщин, показала, что в фазу пролиферации значимо чаще, чем в фазу секреции, в БТС встречались клетки мерцательного эпителия (26,1 и 15,0 % соответственно) и значимо реже – нейтрофилы (20,0 и 39,3 % соответственно). Достоверных же различий по общему цитозу, содержанию макрофагов и эозинофилов в разные фазы цикла отмечено не было.

Сопоставление неэпителиальных цитогрaмм БТС у пациентов с внебольничной пневмонией в динамике показало, что период разгара заболевания характеризовался достоверным повышением общего цитоза (в среднем до 117,0 клеток, контроль – 61,2 клеток), преобладанием нейтрофилов (71,3 %, контроль – 56,2 %), уменьшением количества макрофагов (27,1 %, контроль – 43,5 %). В период разрешения инфильтрации в образцах БТС отмечено достоверное нарастание уровня макрофагов (до 77,2 %) и снижение содержания нейтрофилов (до 20,5 %) при неизменном уровне эозинофилов. Сопоставление в БТС уровней эозинофилов у курящих тем не менее продемонстрировало, что при близких показателях общего цитоза у лиц с индексом курения до 72 пачко-лет среднее содержание эозинофилов в образцах – 0,7 %, у лиц с индексом курения 73–120 пачко-лет – 3,2 %, а у лиц с индексом курения более 120 пачко-лет – 8,2 %. В то же время в образцах, взятых у курящих мужчин того же возраста с индексом курения более 120 пачко-лет без симптомов инфекции нижних дыхательных путей, среднее содержание эозинофилов составило 1,7 %. Это свидетельствует в пользу того, что фактором риска развития эозинофилии в этих условиях стало совместное влияние антибактериальной терапии и интенсивного табакокурения.

У пациентов с острыми респираторными заболеваниями при малоотличимом от группы контроля составе неэпителиальных цитогрaмм отмечалось повышенное количество клеток десквамированного мерцательного эпителия (до 25,6 % в общей цитогрaмме).

При сопоставлении неэпителиальных цитогрaмм БТС у мужчин молодого возраста с разными параметрами табакокурения и клинической симптоматики получены данные о закономерном нарастании цитоза в соответствии с величиной индекса курения и увеличении у асимптомно курящих и больных хроническим бронхитом относительного и абсолютного числа нейтрофилов. В то же время у больных хроническим

Таблица

Сравнительные цитологические характеристики БТС у здоровых некурящих, асимптомно курящих и больных хроническим бронхитом мужчин

Клетки БТС	Здоровые некурящие	Асимптомно курящие (3,2 пачко-лет)	Хронический бронхит (4,6 пачко-лет)	Хронический бронхит (11,5 пачко-лет)
Кол-во клеток, абс.	294	427	1430	2640
Макрофаги, %	78,3	43,5 ¹	55,3	57,5
Нейтрофилы, %	21,7	56,2 ¹	44,3 ¹	41,9 ¹
Эозинофилы, %	0,0	0,3	0,4	0,6
Цитоз, абс. в п.з.	42,1	61,2	119,5 ^{1,2}	165,3 ^{1,2}

¹ Различие с группой некурящих статистически значимо.

² Различие с группой асимптомно курящих статистически значимо.

бронхитом структура цитогрaмм значимо не отличалась от таковой у асимптомно курящих (табл.).

Сравнение цитологических характеристик БТС у больных хроническим бронхитом с относительно длительным стажем табакокурения (в среднем 11,5 пачка/лет) и пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (индекс курения в среднем 26,4 пачка/лет) показало, что величины цитоза у них достоверно не различались (в среднем 165,3 и 122,2 клеток в п.з.), хотя при хронической обструктивной болезни легких отмечен более высокий, чем при хроническом бронхите, уровень нейтрофилов (70,5 и 41,9 % соответственно) и более низкий уровень макрофагов (27,7 и 57,5 % соответственно). Эти различия имели не только относительный, но и абсолютный статистически достоверный характер.

Образцы БТС у пациентов с бронхиальной астмой отличались высоким общим цитозом (в среднем 219 кл. в п.з.) и высокой эозинофилией (в среднем 47,8 %). При среднетяжелом течении бронхиальной астмы отмечались более высокий цитоз и эозинофилия, чем при легком течении. Так, уровень эозинофилов здесь составил 57,6 и 23,8 %, нейтрофилов – 19,1 и 6,9 % соответственно, количество макрофагов достоверно не различалось.

Таким образом, технология неинвазивного получения образцов БТС посредством фарингеальной ловушки подтвердила свою диагностическую значимость и перспективность для дальнейшего использования. Цитологический состав образцов БТС в общем соответствовал известным клеточным параметрам бронхиального секрета у здоровых людей, курильщиков и пациентов с хроническим бронхитом, хронической обструктивной болезнью легких и бронхиальной астмой [4–6]. Метод также проявил себя достаточно чувствительным не только для этих распространенных заболеваний, но и для некоторых доклинических патологических (асимптомное табакокурение) и физиологических (менструальный цикл) процессов.

Диагностическая значимость предлагаемой технологии, подтвержденная результатами клинических

испытаний, дает основание рекомендовать ее использование при изучении воспалительных и иных изменений слизистой оболочки и содержимого дыхательных путей.

Литература

1. Авдеев С.Н., Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Применение метода индуцированной мокроты для оценки интенсивности воспаления в дыхательных путях // Пульмонология. 1987. № 2. С. 82.
2. Амелина Е.Л., Анаев Э.Х., Красовский С.А. и др. Мукоактивная терапия. М.: Атмосфера, 2006. 42 с.
3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / под ред. А.Г. Чучалина. М.: Атмосфера, 2002. 170 с.
4. Добрых В.А., Кортелев В.В., Хелимская И.В. и др. Результаты изучения физических свойств трахеобронхиального секрета у здоровых людей и больных хроническими обструктивными заболеваниями легких // Дальневосточный медицинский журнал. 2005. № 3. С. 44–46.
5. Добрых В.А., Богатков Н.Д., Гнатюк О.П. и др. Диспергационный транспорт бронхолегочного содержимого и его клиническое значение // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2006. № 3. С. 53–55.
6. Самсонова М.В. Диагностические возможности бронхоальвеолярного лаважа // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. 2006. № 4. С. 8–12.
7. Чучалин А.Г., Черняев А.Л., Самсонова М.В. Патологическая анатомия легких: атлас. М.: Атмосфера, 2004. 162 с.
8. Ямицкий Т.Ю., Лифищиц Н.А., Журавлев А.В. Цитологический анализ содержимого бронхов при хронических неспецифических заболеваниях легких и бронхиальной астме // Тер. архив. 1983. №3. С. 140–142.
9. Djukanovic R., Sterk P.J., Fahy J.V., Hargreave F.E. Standardised methodology of sputum induction and processing // Eur. Respir. J. 2002. Vol. 20. P. 1–24.
10. Robinson M., King M., Tomkiewicz R.P. et al. Effects of hypertonic saline, amiloride and cough on mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1994. Vol. 149. P. 669.

Поступила в редакцию 21.02.2011.

BASAL TRACHEOBRONCHIAL SECRETION: NONINVASIVE TECHNOLOGY FOR SAMPLING, COMPARATIVE CYTO-MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS IN CASE OF RESPIRATORY SYSTEM DISEASES

V.A. Dobrykh¹, I.E. Moon¹, E.V. Medvedeva¹, O.A. Kovaleva², E.A. Frolova³

¹ Far Eastern State Medical University (35 Muravieva-Amurskogo St. Khabarovsk 670000 Russia), ² District Military Hospital No. 301 (1 Serysheva St. Khabarovsk 680000 Russia), ³ Clinical Center of Regenerative Medicine and Rehabilitation (76 Zaporina St. Khabarovsk 680000 Russia)

This paper provides description of clinical trials of the device designed for tracheobronchial sampling, in other words – pharyngeal trap. The authors have compared cyto-morphological characteristics of basal tracheobronchial secretion sampled from the healthy volunteers and patients suffering from acute respiratory system diseases. As shown, the cellular composition of the substrate sampled and tracheobronchial secretion were practically identical. Women's cytograms were different at various phases of menstrual period, but no gender differences were found. As regards asymptomatic tobacco smoking, community-acquired pneumonia, acute respiratory diseases, chronic bronchitis, chronic obstructive lung diseases and bronchial asthma, the doctors have revealed specific nosological features of cyto-morphological characteristics of the basal tracheobronchial secretion. The authors' methods are recommended for wide application in clinical practice.

Key words: pharyngeal trap, basal tracheobronchial secretion, cytomorphology.