

## Streszczenie

Zapalenie oskrzelików stanowi główną przyczynę zachorowalności i hospitalizacji dzieci w 1 r.ż. Zgodnie z najbardziej uniwersalną definicją stanowi pierwszy epizod infekcji dolnych dróg oddechowych u dziecka do 1 r.ż, przebiegający z nasilonym kaszlem, świszczącym oddechem, wysiłkiem oddechowym, tachypnoe oraz zmianami osłuchowymi nad polami płucnymi w postaci rozsianych świstów i trzeszczeń. Przebieg zapalenia oskrzelików jest najczęściej łagodny, jednak 1-3% przypadków wymaga hospitalizacji, a 5-10% spośród dzieci przyjętych do szpitala rozwija niewydolność oddechową i wymaga wsparcia oddechowego. Cięższy przebieg ostrego zapalenia oskrzelików dotyczy najczęściej dzieci z: przewlekłymi chorobami układu oddechowego, istotnie hemodynamicznymi wadami serca, chorobami centralnego układu nerwowego, wcześniaków urodzonych <32 t.c oraz pacjentów z niedoborami odporności. Jednakże około połowa hospitalizowanych dzieci nie jest obciążona ww. czynnikami ryzyka, a przebieg ich zachorowania również może być poważny związany z nasilonym wysiłkiem oddechowym, tachypnoe, licznymi zmianami osłuchowymi, obniżoną saturacją. Jako wykładniki ciężkości zachorowania służą również: punktacja w skalach ciężkości (z reguły im wyższa tym bardziej poważny stan pacjenta), liczba dni hospitalizacji i stosowania tlenoterapii (im dłuższe tym cięższy przebieg zachorowania) oraz konieczność terapii w oddziale intensywnej opieki medycznej. O ciężkości zachorowania decyduje interakcja czynników demograficznych, osobniczych, środowiskowych, czynnika zakaźnego oraz odpowiedzi immunologicznej przez niego wywołanej. Spośród tych czynników udokumentowane znaczenie dla ciężkości zachorowania mają: wiek (<=12 t.ż), płeć (męska), masa ciała przy przyjęciu, osobnicze lub rodzinne obciążenie atopią, narażenie na dym tytoniowy in utero i w środowisku domowym, liczba domowników i warunki materialne, karmienie piersią, posiadanie rodzeństwa, urodzenie w miesiącu zimowym. Niepomijalny jest również czynnik infekcyjny najczęściej wirus RS wykrywany w 41-83% przypadków. Kluczowe znaczenie odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu RSV związane jest z usuwaniem zakażonych wirusem komórek i ograniczeniem dalszego rozprzestrzeniania wirusa. Przy znacznym nasileniu reakcji immunologicznej dochodzi do uszkodzenia dróg oddechowych. W odpowiedzi immunologiczną podczas zakażenia RSV zaangażowane są: mechanizmy odporności wrodzonej i nabytej, w tym humoralnej i komórkowej. Limfocyty T (zarówno Th1 jak i Th2) biorą aktywny udział w zwalczaniu zakażenia wirusowego. Większe znaczenie przypisuje się jednak subpopulacji Th1, która poprzez produkcję: INF-gamma, TNF-alfa oraz interleukin: 1, 2, 12, 18 usuwa komórki nabłonka oddechowego zakażone wirusem. Zakażenie RSV stymuluje także odpowiedź zależną od limfocytów Th2, mediowaną przez interleukiny: 4, 5, 6, 9, 10, 13 i jednocześnie zaangażowaną w patomechanizm chorób atopowych, która jest prozapalna oraz antagonistyczna do Th1. Nadal kwestią sporną pozostaje przewaga, którego typu odpowiedzi (Th1 czy Th2-zależnej) odgrywa decydującą rolę w determinacji ciężkości zachorowania z powodu zapalenia oskrzelików.

Za podstawowe cele przeprowadzonego badania uznano: zdefiniowanie, które czynniki demograficzne, osobnicze, środowiskowe wpływają na ciężkość zachorowania oraz ustalenie zależności pomiędzy lokalną odpowiedzią immunologiczną a ciężkością zachorowania na ostre zapalenie oskrzelików. Ponadto celem tego badania było określenie dominującego profilu lokalnej odpowiedzi immunologicznej w zależności od czynników demograficznych, osobniczych, środowiskowych oraz ustalenie korelacji pomiędzy przebiegiem klinicznym, miejscową odpowiedzią immunologiczną a zakażeniem RSV. Do badania kwalifikowano dzieci poniżej 12 m.ż hospitalizowane w Klinice Pneumonologii, Alergologii Dziecięcej i Immunologii Klinicznej z powodu pierwszego w życiu epizodu zapalenia oskrzelików w sezonie infekcyjnym od września do kwietnia. Kryteria wykluczenia stanowiły znane wcześniej lub zdiagnozowane w czasie hospitalizacji przewlekłe choroby układu: oddechowego i krążenia, zespoły aberracji chromosomowych, wcześniactwo <35 tc, choroby nerwowo-mięśniowe, uszkodzenia centralnego układu nerwowego, niedobory odporności. Warunkiem udziału w badaniu było wyrażenie pisemnej zgody przez rodziców lub opiekunów prawnych. W pierwszej, klinicznej części badania przeprowadzono szczegółowy wywiad i badanie przedmiotowe. W wywiadzie zebrany od rodziców/opiekunów uwzględniono dane dotyczące: objawów infekcji dróg oddechowych oraz czasu trwania, przebiegu leczenia przed przyjęciem do szpitala, warunków środowiskowych. Następnie stan kliniczny pacjentów oceniono w oparciu o skalę PRESS (posługującą się parametrami takimi jak: świsty nad polami płucnymi, wysiłek oddechowy i tachypnoe, saturacja <95%, brak lub pogorszenie łaknienia). W trakcie leczenia odnotowywano liczbę dni stosowania tlenoterapii i czas trwania hospitalizacji. W części laboratoryjnej w wyizolowanym z aspiratu z dróg oddechowych materiale przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących interleukiny zaangażowane w odpowiedź Th1-zależną: INF-gamma, TNF-alfa, IL-1 beta, IL-12 i Th2-zależną: IL-4, IL-6, IL-10 oraz chemokinę IL-8. Dodatkowo w celu ustalenia dominującego typu odpowiedzi posłużono się stosunkiem ekspresji genów kodujących IL-4/INF-gamma odzwierciedlającym relacje odpowiedzi Th2 do Th1. W analizie wykorzystano reakcję PCR w czasie rzeczywistym i metodę porównawczą.

Zgodnie z procedurami wewnątrzszpitalnymi u każdego pacjenta w ciągu 24 godzin od przyjęcia wykonywano badanie wymazu z nosogardła w kierunku zakażenia RSV, zdjęcie radiologiczne klatki piersiowej oraz podstawowe badania laboratoryjne (morfologię z rozmazem, stężenie CRP, sodu, potasu oraz gazometrię krwi włóściwkowej). Grupa badana obejmowała 123 pacjentów, 76 chłopców (62%) oraz 47 dziewczynek (38%). Mediana wieku wyniosła 10 tygodni. Stan 18 uczestników (15%) na podstawie skali PRESS został oceniony jako ciężki. Tlenoterapię bierną zastosowano u 76 badanych (61,8%), a mediana czasu jej stosowania wyniosła 2 doby, przedłużonej tlenoterapii (>2 dób) wymagało 42 dzieci (34%). Mediana długości hospitalizacji wyniosła 8 dób, przy czym 50 zakwalifikowanych (41%) wymagało przedłużonego pobytu w szpitalu (>8 dób). Pacjenci, których stan przy przyjęciu został oceniony jako łagodny w skali PRESS byli młodsi niż pozostali, mediana ich wieku wyniosła 8 tygodni w stosunku do chorych, których stan był umiarkowany (11 tygodni) i ciężki (12 tygodni), różnica ta była istotna statystycznie,  $p=0,045$ . Spośród czynników osobniczych urodzenie w miesiącach zimowych (w okresie od grudnia do marca) wiązało się z zwiększonym ryzykiem stosowania przedłużonej tlenoterapii biernej (OR=2,52, 95%CI [1,16-5,47],  $p=0,02$ ) oraz umiarkowanego/ciężkiego stanu w skali PRESS (aOR=2,6, 95%CI [1,08-6,28],  $p=0,03$ ), a alergia pokarmowa z podwyższonym ryzykiem hospitalizacji >8 dób (OR=2,52, 95%CI [1,16-5,47],  $p=0,02$ ). Zamieszkanie w zatłoczeniu ( $\geq 6$  domowników) częściej dotyczyło dzieci w stanie łagodnym niż umiarkowanym/ciężkim w skali PRESS,  $p=0,002$  oraz niewymagających tlenoterapii,  $p=0,03$ . W modelu regresji logistycznej potwierdzono, że zatłoczenie stanowiło czynnik ochronny przed poważnym zachorowaniem na zapalenie oskrzelików definiowanym jako umiarkowany/ciężki stan w skali PRESS (OR=0,12, 95%CI [0,03-0,45],  $p=0,002$ ) i czas stosowania tlenoterapii >2 dób (OR=0,12, 95%CI [0,01-0,92],  $p=0,04$ ). Wykazano niższą ekspresję INF-gamma u dzieci w stanie ciężkim,  $p=0,02$  oraz jej korelację z większą liczbą dób stosowanej tlenoterapii,  $p=0,009$ . Z kolei ekspresja genu IL-12 osiągnęła znacząco wyższy poziom w grupie chorych, u których nie stosowano suplementacji tlenem,  $p=0,02$ , ponadto wykazano jej ujemną korelację z liczbą dób tlenoterapii biernej,  $p=0,004$ . Natomiast pacjenci w stanie ciężkim ( $p=0,02$ ) oraz wymagający prowadzenia tlenoterapii przez ponad 2 doby ( $p=0,01$ ), osiągnęli istotnie wyższy poziom ekspresji TNF-alfa niż pozostali uczestnicy badania. Ekspresja genu kodującego tę interleukinę korelowała z wydłużeniem czasu trwania hospitalizacji,  $p=0,001$ . Z kolei ekspresja genu IL-10 korelowała ujemnie z długością tlenoterapii biernej,  $p=0,03$ .

Dodatkowo przeanalizowano stosunek ekspresji IL-4/INF-gamma odzwierciedlający relacje odpowiedzi Th2 i Th1, nie wykazując przewagi żadnej z nich w zależności od ciężkości epizodu ostrego zapalenia oskrzelików. W grupie najmłodszych dzieci ( $\leq 12$  t.ż) ekspresja genu TNF-alfa była istotnie obniżona, w porównaniu do pacjentów starszych,  $p=0,008$ . W grupie dzieci mieszkających w zatłoczeniu i złych warunkach materialnych ekspresja IL-12 i INF-gamma osiągnęła wyższy poziom (wartości  $p$  wyniosły odpowiednio dla zatłoczenia: 0,05 (INF-gamma) oraz 0,05 (IL-12) i dla warunków materialnych: 0,05 (INF-gamma) oraz 0,03 (IL-12)) w porównaniu do niemowląt pochodzących z rodzin o dobrych warunkach bytowych z mniejszą liczbą domowników. Armienie naturalne wiązało się z obniżeniem ekspresji IL-6 i IL-1 beta (wartości  $p$  wyniosły odpowiednio 0,048 i 0,045), a obciążony atopią wywiad rodzinny z wyższą ekspresją IL-4,  $p=0,03$ . Stan pacjentów zakażonych RSV przy przyjęciu został oceniony jako cięższy - chorzy częściej prezentowali wysiłek oddechowy i tachypnoe niż niezakażeni tym wirusem, a zależności te były istotne statystycznie (wartość  $p$  dla wysiłku oddechowego wyniosła 0,005, a dla tachypnoe 0,004). Dzieci zakażone wirusem RS wymagały większej liczby dób tlenoterapii biernej (2,75 versus 0 dób,  $p < 0,001$ ) oraz dłuższej hospitalizacji (9 versus 8 dób,  $p < 0,001$ ) niż badani, u których nie wykryto zakażenia RSV. U chorych zapaleniem oskrzelików wywołanym przez RSV stwierdzono obniżoną ekspresję interleukin zaangażowanych w odpowiedź Th1 (INF-gamma oraz IL-12) jak i biorących udział w odpowiedzi Th2-zależnej (IL-6 i 10).

Podsumowując, analizowane czynniki demograficzne, osobnicze i środowiskowe (poza urodzeniem w miesiącu zimowym i alergią pokarmową) nie różnicują pacjentów z ciężką postacią zapalenia oskrzelików od tych, których zachorowanie ma charakter łagodny lub umiarkowany. Natomiast czynnik infekcyjny (wirus RS) oraz odpowiedź immunologiczna (oceniana w oparciu o profil interleukin) wpływają na stan pacjenta przy przyjęciu, liczbę dni tlenoterapii i hospitalizacji, co potwierdza ich potencjalną przydatność dla prognozowania ciężkości przebiegu zapalenia oskrzelików.