

*Є.П.Ортеменка*

## **ГІСТОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ ГРАНУЛОЦИТІВ КРОВІ ЗА РІЗНИХ ТИПІВ ЗАПАЛЕННЯ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ У ШКОЛЯРІВ, ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ**

Кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб (зав. – проф. Л.О.Безруков)  
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

**Резюме.** Шляхом цитологічного дослідження індукованого мокротиння у 56 школярів, хворих на бронхіальну астму (БА), встановлено еозинофільний тип запалення бронхіального дерева в 30 дітей (53,6 %), а нееозинофільний – у 26 пацієнтів (46,4 %). У всіх дітей у післянападному періоді визначали гістохімічні показники нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів крові: їх киснезалежний метаболізм за даними тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) та активність перок-

сидази нейтрофільних гранулоцитів (ПНГ). Відмічено, що ці гістохімічні характеристики лейкоцитів крові недоцільно застосовувати для встановлення типу запалення бронхів через низьку специфічність та чутливість тестів.

**Ключові слова:** бронхіальна астма, діти, індуковане мокротиння, типи запалення, гістохімічні показники.

**Вступ.** Аналіз секрету дихальних шляхів при БА за допомогою різних методів (дослідження бронхіального лаважу, спонтанного та індукованого мокротиння) показав, що приблизно в 50 % випадків це захворювання асоціює з нееозинофільним (нейтрофільним) запаленням бронхів [4]. Водночас відмічено, що контроль над нейтрофільною БА з використанням інгаляційних глюкокортикостероїдів видається менш ефективним, ніж при еозинофільній (алергічній) формі захворювання [5, 10]. Виходячи з цього, можна вважати, що визначення характеру запалення дихальних шляхів (ДШ) у дітей, хворих на БА, є важливим клінічним завданням, вирішення якого до-

зволить обирати індивідуалізовану протирецидивну терапію. Однак визначення типу запалення шляхом цитологічного дослідження індукованого мокротиння потребує багато часу, пов'язане з ризиком провокації бронхоспазму та є доступним, переважно, у дітей старшого віку. Внаслідок цього постає питання: чи можливе встановлення типу запалення бронхіального дерева при БА за даними імунологічних показників крові хворих? Водночас діагностична цінність результатів імунологічного дослідження крові дітей, хворих на нееозинофільну та еозинофільну БА, залишаються суперечливими [1, 3, 6, 11]. Можна припустити, що гістохімічні маркери еозинофільних та нейт-

рофільних гранулоцитів крові будуть краще відображувати різні типи запалення ДШ.

**Мета дослідження.** Вивчити діагностичну цінність гістохімічних показників нейтрофілів та еозинофілів крові для верифікації типу запалення бронхіального дерева в дітей шкільного віку, хворих на бронхіальну астму.

**Матеріал і методи.** На базі пульмонологічного відділення ОДКЛ № 1 м. Чернівці обстежено 56 дітей шкільного віку, хворих на БА.

Усім хворим у післянападному періоді БА проводився цитологічний аналіз мокротиння, отриманого методом індукції з використанням серійного розведення натрію хлориду (NaCl) за методом Pavord I.D. [8]. Еозинофільний характер запалення дихальних шляхів діагностували за наявності в мокротинні 3 % і більше еозинофільних лейкоцитів [4, 8, 9]. Нееозинофільний тип бронхіальної астми діагностували при відносному вмісті в цитограмі мукоспінну менше ніж 3 % еозинофілів або за їх відсутності [4, 8, 9].

На підставі результатів цитологічного дослідження мокротиння сформовано дві клінічні групи спостереження. Першу клінічну групу (I) склали 30 дітей (53,6 %) із еозинофільним типом запалення ДШ, який асоціює з алергічною (еозинофільною) формою БА [4, 5, 7]. У подальшому ця група буде визначатися як “алергічна”, “еозинофільна” форма астми. До другої клінічної групи порівняння (II) увійшло 26 (46,4 %) пацієнтів із не еозинофільним (нейтрофільним) типом запалення бронхів, який асоціює з неалергічною (нееозинофільною/нейтрофільною) формою БА [6, 8, 9]. У подальшому ця група буде визначатися як “неалергічна”, “нееозинофільна”, “нейтрофільна” форма захворювання.

Усім дітям у післянападному періоді проводилося імунологічне дослідження крові II рівня, у тому числі визначення популяцій та субпопуляцій лімфоцитів методом Е-розеткоутворення (Jonald, 1972 в модифікації Чернушенко К.Ф., 1978), визначення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) (Константинова І.Л., 1985), визначення активності системи комплементу з урахуванням загальної комплементарної активності (Сх) (Чернушенко К.Ф., 1978).

Водночас із визначенням фагоцитарної активності (ФА) та фагоцитарного числа (ФЧ) нейтрофілів крові, оцінювали ступінь киснезалежного метаболізму еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів крові за даними НСТ-тесту (Park, 1962) та визначали активність пероксидази нейтрофільних гранулоцитів – ПНГ (Graham-Knoll, 1966).

За основними клінічними ознаками групи порівняння були зіставленими. Так, у I групі було 18 хлопчиків (60±8,9 %) та 12 дівчаток (40±8,9 %), а середній вік хворих становив 12,8±6,1 року. У II клінічній групі порівняння хлопчиків було 15 (58±9,9 %) (P>0,05) та 11 (42±9,9 %) дівчаток (P>0,05), а середній вік пацієнтів становив 11,2±6,3

року (P>0,05). У сільській місцевості проживали: в I групі – 19 дітей (63,4±8,8 %), у II групі – 20 хворих (76,9±8,4 %, P>0,05).

**Результати дослідження та їх обговорення.** За результатами клінічного обстеження в I групі атопічну форму захворювання діагностовано у 23 пацієнтів (76,7±7,7 %), змішану – у 7 хворих (23,3±7,7 %), а в II групі – відповідно в 10 (38,5±9,7 %) (P<0,01) та 16 дітей (61,5±9,7 %) (P<0,01). У групі з еозинофільною формою БА контрольований перебіг захворювання спостерігався в 7 хворих (23,3±7,7 %), частково контрольований перебіг реєструвався в 14 дітей (46,7±9,1 %) та неконтрольований – у 9 пацієнтів (30±8,4 %, P>0,05). У школярів із нееозинофільним типом БА такий перебіг захворювання реєструвався відповідно в 7 (27±8,9 %), 15 (57,7±9,9 %) та 4 (15,3±7,2 %, P>0,05) хворих.

Отримані дані аналізувалися за допомогою методів біостатистики та клінічної епідеміології з визначенням специфічності (СТ) та чутливості (ЧТ) тестів.

Варто підкреслити, що в жодного з пацієнтів, яким проведена індукція мокротиння шляхом інгаляції гіпертонічних (3 % та 5 %) розчинів NaCl, не спостерігалось побічних ефектів.

Проведення цитологічного дослідження мокротиння з визначенням типу запалення бронхіального дерева дозволило в 10 (33,3 %) пацієнтів I групи та в 9 хворих (34,3 %) II групи спостереження уточнити діагноз бронхіальної астми за рахунок верифікації форми захворювання.

Порівняльний аналіз показників клітинного імунітету в дітей із еозинофільною та нееозинофільною БА показав, що відносний вміст Т-лімфоцитів крові та їх субпопуляцій, функція яких асоціює з хелперами та супресорами, суттєво не відрізнялися. Так, у пацієнтів із еозинофільною формою захворювання в імунограмі крові відносна кількість Т-лімфоцитів становила 35,3±1,9 %, при відносному вмісті Т-хелперів – 18,6±1,2 % та цитотоксичних супресорів – 16,6±1,7 %. У хворих на нееозинофільну бронхіальну астму ці показники відповідно становили 33,8±1,8 %, 19,0±1,4 %, 14,3±1,5 %, (P>0,05). Отримані дані свідчать про те, що стан клітинного імунітету вірогідно не відрізняється в дітей із різними формами бронхіальної астми, а тому оцінку вмісту в крові хворих Т-лімфоцитів та їх основних субпопуляцій, мабуть, не варто використовувати для оцінки типу запалення ДШ.

Водночас можна припустити, що в дітей із еозинофільним та нейтрофільним типами запалення бронхів гістохімічні показники цих гранулоцитів крові відрізнятимуться та їх можна застосовувати для виявлення форми БА.

У таблиці наведені гістохімічні показники нейтрофільних та еозинофільних лейкоцитів крові, виражені інтегральним цитохімічним коефіцієнтом (у.о.), які зазвичай використовуються для

виявлення алергічної та неалергічної бронхіальної астми в дітей клінічних груп порівняння.

Отримані дані дають підстави вважати, що активація нейтрофільних гранулоцитів крові, яка визначається наявністю позитивного дихального резерву цих клітин (обчислюється як різниця показників стимульованого та спонтанного варіанта НСТ-тесту), притаманна як хворим із «еозинофільною» БА, так і пацієнтам з «нейтрофільною» БА. Проте у хворих із неоеозинофільним типом запалення ДШ децю частіше відмічалася спонтанна активація нейтрофілів за даними НСТ-тесту. Так, відносний вміст фармазанпозитивних нейтрофільних гранулоцитів крові в спонтанному варіанті НСТ-тесту більше ніж 23 %, відмічений у 92±5,4 % дітей із неоеозинофільною БА, а у хворих групи порівняння – у 76,7±7,7 % спостережень ( $P>0,05$ ). Ця активація киснезалежного метаболізму нейтрофільних лейкоцитів крові, напевне, свідчить саме про нейтрофільний характер запалення ДШ. На це непрямо вказувала наявність вірогідних позитивних зв'язків між показниками спонтанного НСТ-тесту нейтрофілів крові та вмістом цих лейкоцитів у мокротинні ( $r=0,4$ ;  $P<0,05$ ), а також здатністю нейтрофільних гранулоцитів мокротиння до фагоцитозу мікроорганізмів за даними ФЧ ( $r=0,6$ ;  $P<0,02$ ). Окрім того, про це непрямо свідчив зворотний корелятивний зв'язок між дихальним резервом нейтрофільних лейкоцитів крові в дітей із неалергічною формою БА та результатами спонтанного НСТ-тесту цих гранулоцитів у мокротинні ( $r=-0,53$ ;  $P<0,02$ ). Однак відсоток фармазанпозитивних нейтрофілів крові в спонтанному варіанті НСТ-тесту  $\leq 23$  %, незважаючи на високу специфічність тесту ( $ST=92$  %), недоцільно використовувати для визначення еозинофільного типу запалення бронхів у зв'язку з тим, що хибнонегативний результат тесту реєструвався в 23 % пацієнтів.

Слід відмітити, що у хворих на еозинофільну БА відмічений негативний дихальний резерв еозинофілів крові, виражений у відсотках фармазанпозитивних клітин, а в пацієнтів із неоеозинофільною БА зареєстровано нульовий дихальний резерв еозинофільних гранулоцитів крові. Це, напевно, свідчить про функціональне виснаження еозинофілів крові внаслідок їх активної участі в підтримці запального процесу, незалежно від типу БА. Це підтверджується наявністю негативного корелятивного зв'язку вмісту нейтрофілів у мокротинні при неоеозинофільному типі запалення бронхів з індексом стимуляції еозинофілів крові ( $r=-0,4$ ;  $P=0,04$ ), що визначався як співвідношення показників стимульованого та спонтанного НСТ-тесту ацидофільних гранулоцитів крові. Це дало підстави припустити, що активація еозинофільних лейкоцитів крові у хворих на БА не визначається типом запалення ДШ, але характер запалення бронхів залежить від цих гранулоцитів.

Відмічено, що в дітей із алергічною формою захворювання частіше ніж у хворих групи порівняння відмічалася пригнічення здатності еозинофілів крові синтезувати біофармазан після додаткової стимуляції. Так, показники стимульованого НСТ-тесту еозинофільних гранулоцитів крові вищі за 19 % зареєстровані в дітей I клінічної групи в 46,7±9,1 % випадків, а у хворих II групи порівняння – у 60±9,8 % випадків ( $P>0,05$ ).

У цілому, попри наявність тенденції до стимуляції киснезалежного метаболізму нейтрофільних чи еозинофільних гранулоцитів крові у хворих на відповідну форму БА, показники НСТ-тесту цих лейкоцитів недоцільно використовувати для визначення типу запалення ДШ. Зокрема, результат стимульованого варіанта НСТ-тесту еозинофілів при застосуванні дискримінантної величини  $\leq 0,2$  у.о. недоцільно застосовувати для підтвердження еозинофільного типу запалення бронхів у зв'язку з низькою чутливістю (62 %) та специфічністю (61 %) тесту.

Відмічено тенденцію до зниження активності пероксидази в нейтрофілах крові при неалергічній астмі, що, вірогідно, свідчило про вихід пероксидази з нейтрофільних лейкоцитів крові у відповідь на провокуючий фактор. Так, у I групі вміст пероксидази НГ крові  $<1,5$  у.о. відмічений у 8 хворих (40 %), а в II групі – у 12 пацієнтів (66,7 %) ( $P>0,05$ ). Попри тенденцію до зниження активності ПНГ крові при неоеозинофільній астмі показники цієї реакції при розподільчій точці  $<1,5$  у.о. недоцільно використовувати як маркер нейтрофільного запалення ДШ через низьку специфічність (60 %) та чутливість (67 %) тесту.

Варто відзначити, що в дітей із неоеозинофільною формою БА відмічається вищий рівень вмісту комплементу в сироватці крові. Так, частота випадків, коли рівень Сх був вищий за 0,06 у.о., у цій групі становила 24±8,5 %, а при еозинофільній астмі – 3,3±3,3 % ( $P<0,05$ ). Це може свідчити про зниження синтезу комплементу або про посилене його споживання за алергічної БА. Вірогідно вищий рівень вмісту циркулюючих імунних комплексів у хворих I клінічної групи хворих, ( $P<0,05$ ) свідчив, мабуть, на користь посиленого споживання комплементу на утворення ЦІК [2]. Частота випадків, коли вміст ЦІК перевищував 170 умовних одиниць при еозинофільній астмі становила 46,7±9,1 % випадків, а в пацієнтів із нейтрофільною астмою – лише 12±6,5 % спостережень ( $P<0,05$ ). У групі хворих із еозинофільним типом запалення ДШ зареєстровано прямий кореляційний зв'язок кількості еозинофілів у мокротинні з рівнем ЦІК у крові ( $r=0,4$ ;  $P=0,03$ ). Натомість, наявність вмісту в крові ЦІК більше ніж 170 у.о., попри високу специфічність тесту ( $\zeta G=88$  %), недоцільно використовувати як маркер еозинофільного запалення через те, що хибнонегативні результати реєструвалися в кожній другій дитині.

**Гістохімічні показники нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитів крові в дітей груп порівняння (у.о.)**

Клінічні групи	НСТ-тест				Активність ПНГ
	нейтрофілів		еозинофілів		
	Спонтанний	Стимульований	Спонтанний	Стимульований	
I n=30	0,5±0,04	0,6±0,05	0,2±0,02	0,2±0,02	1,5±0,1
II n=25	0,5±0,05	0,7±0,05	0,2±0,02	0,3±0,02	1,4±0,1
P – немає відмінностей (НВ)	НВ	НВ	НВ	НВ	НВ

**Висновки**

1. Метод цитологічного дослідження індукованого мокротиння в 53,6 % випадків дозволяє підтвердити наявність еозинофільної бронхіальної астми, а в 46,4 % спостережень – нееозинофільну форму захворювання.

2. Гістохімічні показники еозинофілів та нейтрофілів крові, зокрема показники НСТ-тесту стимульованих еозинофілів  $\leq 0,2$  у.о.; спонтанного НСТ-тесту нейтрофілів  $\leq 23$  %; активність пероксидази нейтрофільних гранулоцитів  $> 1,5$  у.о. та вміст у крові циркулюючих імунних комплексів у межах  $> 170$  у.о., недоцільно використовувати для виявлення еозинофільної форми бронхіальної астми в дітей шкільного віку через низьку специфічність та чутливість тестів.

**Перспективи подальших досліджень.** Для підвищення ефективності контролю над бронхіальною астмою дослідити клінічні особливості еозинофільної та нееозинофільної форми захворювання, показники гіперреактивності бронхів за різних типів запалення дихальних шляхів.

**Література**

1. Волосовець О.П., Ковбаско Е.М. Взаємозв'язок між показниками мікробіологічного та цитологічного складу бронхіального вмісту та станом природної резистентності організму в дітей із бронхіальною астмою, яка ускладнена респіраторною інфекцією // Вестн. фізіотерапії и курортол. – 2001. – Т. 7, № 2. – С. 74-78.
2. Дранник Г.Н. Строение и функции иммунной системы. Лекция № 2. Врожденный неспецифический (естественный) иммунитет. Гуморальный иммунитет // Клини. иммунол., аллергол., инфектол. – 2005. – № 1. – 7 с.

3. Прунчак С.І. Клініко-імунологічна характеристика бронхіальної астми в дітей з різними типами ацетилювання // Автореф. дис... на здобуття наукового ступеня к.мед.н. – Львів, 2006. – 20 с.
4. Douwes J., Gibson P., Pekkanen J. and Pearce N. Non-eosinophilic asthma: importance and possible mechanisms // Thorax. – 2002. – V. 57. – P. 643-648.
5. Green R.H., Brightling C.E. et al. Analysis of induced sputum in adults with asthma: identification of subgroup with isolated sputum neutrophilia and poor response to inhaled corticosteroids // Thorax. – 2002. – V. 57. – P. 875-879.
6. Pavord I.D. Non-eosinophilic asthma and the innate immune response // Thorax. – 2007. – V. 62. – P. 193-194.
7. Simpson J.L., Grissell T.V. et al. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis // Thorax. – 2007. – V. 62. – P. 211-218.
8. Sharma Sonal and Khanna Geetika. Noninvasive monitoring of airway inflammation // Indian J. Allergy Asthma Immunol. – 2001. – V. 15. – P. 75-86.
9. Wardlaw A. J., Brightling C. E., Green R., Woltmann G. New insights into the relationship between airway inflammation and asthma // Clinical Science. – 2002. – V. 103. – P. 201-211.
10. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma // Clin. Exp. Allergy. – 2003. – V. 33. – P. 1622-1628.
11. Ying Sun, Zhang Guizhen et al. How much do we know about atopic asthma: where are we now? // Cell. and Molec. Immun. – 2006. – V. 3, № 5. – P. 321-332.

**ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ ТИПАХ ВОСПАЛЕНИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ У ШКОЛЬНИКОВ, БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ**

*Е.П.Ортеменка*

**Резюме.** Путем цитологического исследования индуцированной мокроты у 56 школьников, больных бронхиальной астмой, установлен эозинофильный тип воспаления бронхиального дерева у 30 детей (53,6 %), а неэозинофильный – у 26 пациентов (46,4 %). У всех детей в послеприступный период определяли гистохимические показатели

нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов крови: их кислородозависимый метаболизм по данным теста с нитросиним тетразолам (НСТ-тест) и активность пероксидазы нейтрофильных гранулоцитов (ПНГ). Отмечено, что эти гистохимические характеристики лейкоцитов крови нецелесообразно использовать для установления типа воспаления бронхов вследствие низких специфичности и чувствительности тестов.

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, индуцированная мокрота, типы воспаления, гистохимические показатели.

## **HISTOCHEMICAL INDICES OF BLOOD GRANULOCYTES WITH DIFFERENT TYPES OF AIRWAYS INFLAMMATION IN SCHOOL AGE CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA**

*Ye.P.Ortemenka*

**Abstract.** Among 56 school age children with bronchial asthma (BA) the eosinophilic type of the bronchial tree inflammation has been identified in 30 patients (53,6 %), whereas the non- eosinophilic type – in 26 cases (46,4 %) by means a cytological investigation of induced sputum. Histochemical characteristics of blood eosinophils and neutrophils: their oxygen dependent metabolism based on the data of the nitro-blue tetrazolium test (NBT- test) and the activity of neutrophilic granulocyte peroxidase (NGP), identified in all the children during the postattack stage of asthma has been determined. It has been marked that it is not advisable to use these histochemical indices of blood leucocytes as a marker of bronchial eosinophilic inflammation due to a low sensitivity and specificity of the tests.

**Key words:** bronchial asthma, children, induced sputum, inflammation types, histochemical characteristics.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Т.В.Сорокман

Buk. Med. Herald. – 2008. – Vol. 12, № 1.–P. 37-41

Надійшла до редакції 21.11.2007 року