

МЕДИЧНІ НАУКИ

УДК 616.248:575.21]:616.15+616-008.8]-07-053.5

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ПОКАЗНИКІВ КИСНЕЗАЛЕЖНОГО МЕТАБОЛІЗМУ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ КРОВІ ТА МОКРОТИННЯ У ШКОЛЯРІВ, ХВОРИХ НА НЕЕОЗИНОФІЛЬНИЙ ФЕНОТИП БРОНХІАЛЬНОЇ АСТМИ

Буринюк Х.П., Ортеменка Є.П.

Буковинський державний медичний університет

На підставі результатів цитологічного аналізу індукованого інгаляціями серійних розведень гіпертонічних розчинів (3%, 5%, 7%) натрію хлориду мокротиння, проведеного у 116 хворих на бронхіальну астму школярів, верифікований нееозинофільний фенотип захворювання у 49 (42,2%) пацієнтів. Встановлено, що у дітей шкільного віку, хворих на нееозинофільну бронхіальну астму, відбувається виснаження киснезалежної метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів мокротиння при одночасній активації зазначеної функціональної здатності нейтрофілів крові, причому ці процеси є взаємопов'язаними та дискретними та підкреслюють важливу роль вивчених лейкоцитів в реалізації хронічного місцевого запального процесу.

Ключові слова: бронхіальна астма, діти, фенотипи, індуковане мокротиння, нейтрофіли, функціональна здатність.

Постановка проблеми. Згідно сучасних поглядів, найбільш значущими патофізіологічними компонентами бронхіальної астми (БА) виступають хронічне запалення дихальних шляхів та асоційована з ним гіперсприйнятливість бронхів на впливи тригерних факторів [1, с. 140]. При цьому роль еозинофільних лейкоцитів, лімфоцитів та опасистих клітин в розвитку запальної відповіді дихальних шляхів (ДШ) донедавна визначалася провідною в патогенезі алергічних хвороб, що відобразилося у визнанні інгаляційних глюкокортикостероїдів, здатних пригнічувати активацію імунної відповіді по так званому Th2-шляху, асоційованому із гіпереозинофілією, як «золотого стандарту» базисного протизапального лікування БА [2, с. 384; 3, с. 1].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Упродовж останньої декади завдяки широкому впровадженню в практику цитологічного дослідження мокротиння, отриманого неінвазивним шляхом індукції аерозолями гіпертонічних розчинів натрію хлориду [4, с. 319], парадигма відносно провідної ролі еозинофільних гранулоцитів у розвитку БА значно похитнулася, а саме чисельні дослідження показали, що лише в 50% астма асоціює з еозинофільним характером запалення ДШ [2, с. 385; 5, с. 193], а у більшості випадків так званої «нееозинофільної астми» основними ефекторними клітинами місцевого запалення бронхів виступають нейтрофільні гранулоцити [2, с. 386; 3, с. 3; 6, с. 257].

Нейтрофіли – це поліморфноядерні лейкоцити, що відіграють провідну роль в імунній системі, забезпечуючи, зокрема, першу лінію захисту проти бактеріальних та грибкових збудників. Нейтрофіли представлені у найбільшій кількості, відносно інших клітин запалення, в циркулюючій крові і тканинах, особливо у легенях. Такий тканинний резервуар нейтрофілів дозволяє швидко залучати їх за потреби у відповідь на провокуючі чинники. Одними з перших нейтрофільні гранулоцити рекрутуються в дихальні шляхи після

впливу алергенів або інших пошкоджувальних чинників [6 с. 256; 7, с. 342].

Донедавна роль нейтрофільних лейкоцитів у запальних процесах обмежувалася їх здатністю до фагоцитозу та продукцією цитотоксинів, але наразі накопичені дані щодо синтезу нейтрофілами інших різноманітних медіаторів (металопротеаз, еластази, лейкотрієнів, інтерлейкіну-8), які відіграють значну роль у пошкодженні ДШ при бронхіальній астмі. Водночас, нейтрофіли – це основне джерело супероксиданіону та інших оксидантів (пероксиду водню, гіпохлорної кислоти), які в асоціації з нейтрофільними протеазами, посилюють пошкодження бронхіального дерева та легеневої тканини [6, с. 257; 7, с. 348; 8, с. 2].

Наразі доведена асоціація нейтрофільного характеру запалення ДШ із тяжкими і резистентними до глюкокортикостероїдів фенотипами бронхіальної астми, професійною і «нічною» астмою, загостренням астми і астмою у курців, а також із так званою «фатальною астмою раптового початку» [2, с. 385; 5, с. 193; 8, с. 4; 9, с. 1045].

Водночас, оприлюднені дані щодо асоціації нейтрофільного запалення ДШ зі зниженням функціональної здатності легень, а також щодо ролі нейтрофільних гранулоцитів у процесі структурних змін ДШ, тобто їх ремоделювання [1, с. 141; 10, с. 525], котре, в свою чергу, повсякчас зумовлює зменшення гіперсприйнятливості бронхів. При цьому, зниження бронхіальної гіперреактивності у таких випадках відносять до захистного механізму, котрий попереджує миттєву та потужну, а в частині випадків – фатальну для хворих, бронхообструкцію у відповідь на мінімальні концентрації провокувального чинника. Проте, в інших дослідженнях доведений взаємозв'язок функціональної здатності нейтрофілів [7, с. 350; 9, с. 1050] зі зростанням ознак бронхіальної гіперреактивності.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Слід відзначити обмеженість оприлюднених даних щодо метаболічної актив-

ності нейтрофілів в хворих на БА дитячого віку [10, с. 524; 11, с. 24], оскільки більшість досліджень у даному напрямку представлена експериментальними даними та у дорослій популяції [5-9; 12, с. 3].

Враховуючи, що лейкоцити рекрутуються в дихальні шляхи з циркулюючої крові, а також значущість функціональної активності гранулоцитів в реалізації запальної відповіді бронхів при БА, видавалося доцільним порівняти показники киснезалежної здатності нейтрофільних гранулоцитів крові та бронхіального дерева у дітей шкільного віку хворих, на нейтрофільний фенотип БА.

Мета статті. Порівняти киснезалежну здатність нейтрофільних гранулоцитів крові та індукованого мокротиння у дітей шкільного віку, хворих на неозинофільний фенотип бронхіальної астми.

Виклад основного матеріалу дослідження. На базі пульмонологічного відділення ОДКЛ м. Чернівці в постприступний період обстежено 116 дітей шкільного віку, хворих на персистуючу БА. Усім дітям проводився цитологічний аналіз мокротиння, отриманого методом індукції, з використанням серійних розведень гіпертонічних розчинів (3%, 5%, 7%) натрію хлориду, за методом Ravord I.D. у модифікації Pizzichini M.M. (1996 р.). Оцінку активності киснезалежного метаболізму нейтрофільних гранулоцитів периферійної крові та мокротиння проводили гістохімічним методом за даними спонтанного і стимульованого тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест) за методом Park V.H. et al. (1968) у модифікації Клімова В.В. та співав. (1982). Результати тесту оцінювали за цитохімічним коефіцієнтом (ЦХК, ум.од.), який обчислювали за формулою Astaldi G., Verga L. (1957), а також із урахуванням вмісту у пробі формазанпозитивних клітин (%). Індекс стимуляції обчислювали як відношення результатів стимульованого тесту до спонтанного, а резерв киснезалежної мікробіцидності вказаних лейкоцитів – як різницю цих показників.

Неозинофільний/нейтрофільний фенотип БА діагностували при відносному вмісті в цитологічному аналізі мокротиння менше ніж 3% еозинофілів або за їх відсутності [2, с. 386; 4, с. 320; 11, с. 25] у 49 (42,2%) пацієнтів, серед яких частина хлопчиків становила 60%, у сільській місцевості проживали 70% хворих, а середній вік пацієнтів становив 11,0±0,4 років.

Отримані дані аналізували з використанням параметричних і непараметричних методів біостатистики. Вірність нульової гіпотези визначалася з урахуванням рівня значущості «Р» (методом Стьюдента) та «Рф» (методом кутового перетворення Фішера).

Встановлено, що за ступенем тяжкості захворювання серед обстежених хворих домінував середньотяжкий перебіг захворювання (62% пацієнтів), легкий перебіг астми реєструвався в 26% випадків, а тяжка астма – лише в 12% спостережень.

Порівняльна характеристика функціональної активності нейтрофілів крові та мокротиння (за даними НСТ-тесту) в групі пацієнтів із неозинофільним характером запалення бронхів представлена в таблиці 1.

Аналіз отриманих даних вказує на значне метаболічне виснаження нейтрофільних грануло-

цитів в дихальних шляхах відносно нейтрофілів крові, що, можливо, відображує стан місцевого імунітету бронхів в післянападний період захворювання.

Таблиця 1

Показники киснезалежного метаболізму нейтрофілів крові та мокротиння у дітей, хворих на нейтрофільний фенотип бронхіальної астми, М±m

Показники киснезалежного метаболізму нейтрофілів	кров n=49	мокротиння n=42	P
Спонтанний НСТ-тест	% 36,8±2,37	17,7±1,33	<0,01
ЦХК, ум. од.	0,46±0,03	0,22±0,02	<0,01
Стимульований НСТ-тест	% 50,9±2,8	21,5±1,7	<0,01
ЦХК, ум. од.	0,66±0,04	0,27±0,03	<0,01
Резерв нейтрофілів (%)	14,2±2,2	3,8±1,1	<0,01
Індекс стимуляції нейтрофілів (ум.од.)	1,5±0,08	1,3±0,10	>0,05

Нааявність у обстежених дітей зворотного кореляційного зв'язку показників спонтанного ($r=-0,5$; $P=0,002$) та стимульованого ($r=-0,5$; $P=0,001$) варіантів НСТ-тесту нейтрофільних гранулоцитів із відносною кількістю цих клітин у мокротинні, непрямо підтверджувала припущення стосовно того, що запальна відповідь ДШ обумовлена переважно їх функціональною активністю. Про активацію функціональної здатності нейтрофілів при неозинофільній астмі у дітей свідчило те, що при стимуляції нейтрофільних гранулоцитів мокротиння пірогеналом зберігали високі показники «респіраторного збурху». Так, більшу за норму (>21%) відносну кількість фармазан-позитивних нейтрофілів мокротиння після стимуляції відмічено у половини школярів (52,4%) із нейтрофільною астмою.

При цьому, у дітей із нейтрофільним астма-фенотипом дихальний резерв, що відображує активність киснезалежного метаболізму гранулоцитів, був майже вдвічі меншим (3,8 ум. од.) в нейтрофілів респіраторного тракту відносно нормативних даних (6,6 ум. од.), проте вдвічі більшим (14,2 ум. од.) в нейтрофільних лейкоцитів крові, що, ймовірно, вказує на системну активацію пулу нейтрофільних лейкоцитів, проте виснаження їх функціональної здатності в організмі внаслідок реалізації місцевого хронічного запалення ДШ.

Нааявність вірогідного зворотного зв'язку індексу стимуляції нейтрофільних лейкоцитів крові та показників НСТ-тесту нейтрофілів мокротиння: стимульованого варіанту за вмістом формазанпозитивних клітин ($r=-0,4$; $P=0,02$) і за даними ЦХК ($r=-0,3$; $P=0,04$), та резерву нейтрофілів ($r=-0,3$; $P=0,04$) в когорті обстежених дітей непрямо підтверджувала припущення щодо виснаження киснезалежної метаболічної здатності нейтрофілів в процесі реалізації неозинофільної запальної відповіді бронхів.

Висновки і пропозиції. У дітей шкільного віку, хворих на неозинофільну бронхіальну астму відбувається виснаження киснезалежної метаболічної активності нейтрофільних гранулоцитів мокротиння при одночасній активації зазначеної

метаболической способности нейтрофилов крови, причому эти процессы являются взаимозависимыми и дискретными и подчеркивают важную роль изученных лейкоцитов в реализации хронического местного воспалительного процесса. С клинической точки зрения, пациенты с неэозинофильным астма-фенотипом требуют

направления лечебно-профилактических мероприятий в сторону нормализации функции изученных клеток, а именно включения в базисной противовоспалительной терапии так называемых «антинейтрофильных» препаратов (метилксантинив спазмолитической, пролонгированных бета-2-агонистов, макролидов и др.).

Список литературы:

1. Airway inflammation and bronchial hyperreactivity in steroid naive children with intermittent and mild persistent asthma / M. Toyran, A. Bakirtas, F. Dogruman-Al [et al.] // *Pediatric Pulmonology*. – 2014. – Vol. 49, № 2. – P. 140–147.
2. Cowan D. C. Effects of steroid therapy on inflammatory cell subtypes in asthma / D. C. Cowan, J. O. Cowan, R. Palmay [et al.] // *Thorax*. – 2010. – Vol. 65. – P. 384–390.
3. Clinical asthma phenotypes and therapeutic responses / M. Zedan, G. Attia, M. M. Zedan, A. Osman [et al.] // *ISRN Pediatrics*. – 2013. – P. 1–7.
4. Lex C. Sputum induction in children with difficult asthma: safety, feasibility and inflammatory cell patterns / C. Lex, D. N. Rayne, A. Zacharasiewicz, L. Li [et al.] // *Pediatr. Pulmon.* – 2005. – Vol. 39. – P. 318–324.
5. Pavord I. D. Non-eosinophilic asthma and the innate immune response / I. D. Pavord // *Thorax*. – 2007. – Vol. 62. – P. 193–194.
6. Fahy J. Eosinophilic and neutrophilic inflammation in asthma. Insights from clinical studies / J. Fahy // *Proc. Am. Thoracic Soc.* – 2009. – Vol. 6. – P. 256–259.
7. Monteseirín J. Neutrophils and Asthma / Monteseirín J. // *Investig. Allergol. Clin. Immunol.* – 2009. – Vol. 19 (5). – P. 340–354.
8. Bruijnzeel Piet L. B. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? / Piet L. B. Bruijnzeel, M. Uddin, L. Koenderman // *J. Leukoc. Biol.* – 2015. – Vol. 98. P. 1–8; doi: 10.1189/jlb.3VMR1214-600RR.
9. Haldar P. Noneosinophilic asthma: a distinct clinical and pathologic phenotype / P. Haldar, I. D. Pavord // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119, № 5. – P. 1043–1052.
10. Pediatric asthma control in Asia: Phase 2 of the Asthma Insights and Reality in Asia-Pacific (AIRIAP 2) survey // G. W. K. Wong, N. Kwon, J. G. Hong [et al.] // *Allergy*. – 2013. – Vol. 68. – P. 524–530.
11. Ortemenka Ye. P. Indices of cytotoxic activity of neutrophilic granulocytes of sputum in patients with bronchial asthma and healthy children / Ye. P. Ortemenka // *Internal. J. Pediatr. Obstetric. Gynecol.* – 2013. – Vol. 4 (2). – P. 23–27.
12. Cellular Mechanisms Underlying Eosinophilic and Neutrophilic Airway Inflammation in Asthma / G. Pelaia, A. Vatrella, M. T. Busceti, L. Gallelli, C. Calabrese, R. Terracciano, R. Maselli // *Mediators of Inflammation*. – 2015. – Vol. 2015, Article ID 879783, 8 pages. – <http://dx.doi.org/10.1155/2015/879783>

Буринюк К.П., Ортеменка Е.П.

Буковинский государственный медицинский университет

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КИСЛОРОДОЗАВИСИМОГО МЕТАБОЛИЗМА НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ И МОКРОТЫ У ШКОЛЬНИКОВ С НЕЭОЗИНОФИЛЬНЫМ ФЕНОТИПОМ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Аннотация

На основании цитологического анализа мокроты, индуцированной ингаляциями серийных разведений гипертонических растворов (3%, 5%, 7%) натрия хлорида, проведенного у 116 больных бронхиальной астмой школьников, верифицирован неэозинофильный фенотип заболевания у 49 (42,2%) пациентов. Установлено, что у детей школьного возраста, страдающих неэозинофильной бронхиальной астмой, происходит истощение кислородозависимой метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов мокроты при одновременной активации упомянутой функциональной способности нейтрофилов крови, причем эти процессы являются взаимосвязанными и дискретными и подчеркивают важную роль изученных лейкоцитов в реализации хронического воспалительного процесса дыхательных путей.

Ключевые слова: бронхиальная астма, дети, фенотипы, индуцированная мокрота, нейтрофилы, функциональная способность.

Burinuk K.P., Ortemenka Ye.P.
Bukovinian State Medical University

**COMPARATIVE ANALYSIS OF OXYGEN-DEPENDENT METABOLISM
OF NEUTROPHILES IN BLOOD AND SPUTUM IN SCHOOL-AGE CHILDREN
WITH NONEOSINOPHILIC BRONCHIAL ASTHMA PHENOTYPE**

Summary

Based on the cytological analysis of sputum, induced by inhalation of hypertonic solutions (3%, 5%, 7%) of sodium chloride, conducted in 116 school-age children with bronchial asthma, the noneosinophilic asthma phenotype has been verified in 49 (42,2%) patients. It has been found that noneosinophilic asthma in school-age children characterized by depletion of oxygen- dependent metabolic activity of sputum neutrophils with simultaneous activation of above mentioned functional capacity of blood neutrophils, and these processes are interrelated and discrete and, as well, emphasize the importance of the studied leukocytes in the chronic airways inflammation.

Keywords: bronchial asthma, children, phenotypes, induced sputum, neutrophils, functional capacity.