

Діагностичне значення показників метаболічної та функціональної активності ефекторних клітин (еозинофілів, нейтрофілів) у верифікації фенотипу тяжкої бронхіальної астми у дитячому віці

О.В. Белашова, асистент, кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб
Буковинського державного медичного університету, м. Чернівці

Незважаючи на те, що частота фенотипу *тяжкої бронхіальної астми* (БА) становить не більше 10% серед усіх хворих на БА, перебігу захворювання в цих пацієнтів притаманні нестабільність й неконтрольованість [1, 3]. Наявність тяжкої форми БА спричинює розвиток і поглиблення соціальної дезадаптації та емоційного дискомфорту, що негативно позначається на якості життя дітей [4, 8]. Нині тяжка бронхіальна астма розглядається як результат неадекватно лікованого середньотяжкого її варіанта або ж як окремий фенотип захворювання чи навіть окрема нозологічна форма [10, 11]. Водночас чинні критерії тяжкої БА є суб'єктивними й часто залежать від самооцінки пацієнта. Це насамперед утруднює диференціацію із середньотяжким варіантом захворювання, що зумовлює в одних випадках недооцінку тяжкості, в інших – гіпердіагностику, а загалом утруднює вибір адекватного обсягу терапії та унеможливує досягнення й утримання оптимального контролю [12, 13]. Окрім недостатньої об'єктивності критеріїв тяжкості, верифікація тяжкої БА утруднена також і наявністю різних фенотипів захворювання [4, 6, 7].

Згідно з сучасними поглядами, серед ключових клітин, активно задіяних у формуванні алергічного запалення в бронхах при розвитку БА, провідну роль відіграють еозинофільні та нейтрофільні гранулоцити крові [1, 2, 4]. Прозапальні властивості цих клітин зумовлені дією лужних білків, які містяться в їхніх гранулах. Цим білкам притаманна цитотоксичність, вони стимулюють дегрануляцію опасистих клітин та базофілів [8, 11, 12]. У деяких літературних джерелах є дані про підвищення показників функціональної та метаболічної активності еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів крові за наявності фенотипу тяжкої БА у дітей [4, 6, 10]. Однак за іншими даними, при тяжкій БА відзначається зниження функціональної та метаболічної активності еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів, що пов'язано з виснаженням їхнього метаболічного потенціалу при тривалій алергенній стимуляції [7, 15, 16]. Літературні повідом-

лення про використання змін показників метаболічної та функціональної активності еозинофілів та нейтрофілів крові для вирізнення фенотипу тяжкої БА нечисленні та суперечливі [12, 13]. В одних джерелах вказується на достатню діагностичну цінність зазначених показників при встановленні цього фенотипу БА у дітей [14, 17]; інші автори доводять, що використання лише показників активності еозинофільних та нейтрофільних лейкоцитів крові є малоінформативним для підтвердження чи спростування наявності фенотипу тяжкої БА у дитячому віці [2, 7].

Літературний огляд сучасних наукових джерел з урахуванням актуальності проблеми ранньої верифікації фенотипу тяжкої БА зумовив доцільність проведення аналізу зміни метаболічної та фагоцитарної активності еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів та визначення його діагностичного значення для верифікації фенотипу тяжкого перебігу БА у дітей.

Мета роботи – вивчення діагностичної цінності показників метаболічної активності ефекторних клітин (еозинофілів та нейтрофілів крові) для верифікації фенотипу тяжкої бронхіальної астми у дітей і оптимізації індивідуалізованого адресного лікування.

Матеріали і методи

Для досягнення поставленої мети сформовано дві клінічні групи. Першу (I, основну) групу сформували 39 дітей із фенотипом тяжкої БА; до другої (II, групи порівняння) клінічної групи увійшло 36 пацієнтів із БА середнього ступеня тяжкості. Ступінь тяжкості визначали згідно з чинними рекомендаціями міжнародної педіатричної групи GINA (Global Initiative for Asthma). За основними характеристиками групи були зіставними. Середній вік пацієнтів основної групи становив $12,5 \pm 0,5$ року, групи порівняння – $11,8 \pm 0,6$ року ($p > 0,05$). Частка хлопчиків серед хворих I клінічної групи становила 61,2 \pm 3,5%, серед дітей II групи – 63,4 \pm 3,1% ($p > 0,05$).

Як показники функціонального стану еозинофільних та нейтрофільних лейкоцитів крові визначали їхню фагоцитарну активність (ФА, %) та фагоцитарне число (ФЧ, у. о.) за методом Є.Н. Мосягіної [9]. Активність киснезалежного метаболізму гранулоцитів проводили шляхом обчислення процентного вмісту формазан-позитивних клітин у тесті відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тесті) з урахуванням цитохімічного коефіцієнта (ЦХК, у. о.), визначеного за принципом G. Astaldi, L. Verga [5].

Внутрішньоклітинний вміст еозинофільних та нейтрофільних катіонних білків (в у. о.) визначали за методом В.Є. Пігаревського, активність пероксидази (в у. о.) – за методом Грехема – Кнолля [5]. Робота виконана згідно з вимогами до рандомізованого порівняльного дослідження у паралельних групах за методом «дослід-контроль». Отримані результати дослідження аналізували за допомогою методів біостатистики і клінічної епідеміології [14]. При нормальному розподілі використовували параметричні методи аналізу з оцінкою відмінностей за Стьюдентом (критерій t). Обробку даних проводили з використанням пакету прикладних програм «STATISTICA 7,0». Для встановлення діагностичної цінності тестів визначали їхню чутливість (ймовірність того, що тест буде позитивним за наявності хвороби), специфічність (ймовірність того, що тест буде негативним, коли хвороби немає), передбачувану позитивну та негативну цінність (ймовірність того, що хвороба є або її немає в тих випадках, коли тест позитивний чи негативний). З позиції клінічної епідеміології оцінювали атрибутивний ризик, відносний ризик та пропорційність шансів, тобто співвідношення імовірності події в основній групі відносно групи порівняння з обчисленням довірчих інтервалів (ДІ) для відносного ризику і відношення ризиків – пропорційності шансів (95% ДІ). [14].

Результати дослідження

Враховуючи дані літератури стосовно того, що серед багатьох клітин алергічного запалення провідну роль відіграють еозинофільні та нейтрофільні гранулоцити крові [11, 12], за доцільне вважали вивчення показників метаболічної активності цих

лейкоцитів для оцінки їхнього діагностичного значення у хворих на тяжку БА. *Киснезалежну метаболічну активність гранулоцитів крові* визначали за даними НСТ-тесту в спонтанному та стимульованому варіантах. Результати НСТ-тесту з нейтрофільними гранулоцитами крові у хворих на тяжку та середньотяжку БА наведені у **таблиці 1**.

Як видно з представлених даних, не вдалося знайти вірогідної різниці між показниками НСТ-тесту з нейтрофілами хворих двох груп, які порівнюються. Однак у представників I групи спостереження виявлено вірогідний корелятивний зв'язок ($r = 0,85, p < 0,05$) між показниками *стимульованого та спонтанного НСТ-тесту* з нейтрофільними лейкоцитами крові за ЦХК, що підтверджує літературні повідомлення про активну участь цих гранулоцитів у розвитку БА у дитячому віці [16, 17].

Між хворими груп спостереження виявлено статистично вірогідну різницю за показниками *метаболічного резерву нейтрофільних гранулоцитів* крові, який визначали як різницю між визначеними при проведенні стимульованого та спонтанного НСТ-тесту значеннями ЦХК. Так, у хворих I клінічної групи він становив $10,1 \pm 3,8$ у. о., а у пацієнтів групи порівняння – $13,7 \pm 2,2$ у. о. ($p < 0,05$). Як видно із цих даних, у дітей, хворих на тяжку БА, значення резерву нейтрофілів крові за даними НСТ-тесту було зниженим, якщо порівняти з аналогічним показником у хворих із середньотяжкою БА. Це може вказувати на виснаженість метаболічних можливостей таких лейкоцитів у представників I групи спостереження.

У дітей груп порівняння не встановлено вірогідної різниці за показником *фагоцитарної активності* нейтрофілів крові. У дітей I клінічної групи він становив $77,2 \pm 5,5\%$, а у представників II групи – $81,2 \pm 7,1\%$ ($p > 0,05$). Рівень *фагоцитарного числа* нейтрофілів у дітей із фенотипом тяжкої БА становив $8,3 \pm 1,5$ у. о., а у пацієнтів групи порівняння – $7,6 \pm 3,1$ у. о. ($p > 0,05$). Однак у пацієнтів із тяжкою БА відзначено тенденцію до нижчих показників ФА нейтрофільних гранулоцитів крові, що може вказувати на їхню функціональну виснаженість під впливом тривалої алергенної стимуляції. При цьому середньогруповий показник ФЧ нейтрофілів периферичної крові, який характеризує рівень метаболіч-

Таблиця 1. Показники функціональної активності нейтрофільних гранулоцитів крові у дітей груп порівняння, визначені за допомогою НСТ-тесту

Клінічні групи	Кількість дітей	Показники НСТ-тесту			
		Спонтанного		Стимульованого	
		Частка формазан-позитивних клітин, %	ЦХК, у. о.	Частка формазан-позитивних клітин, %	ЦХК, у. о.
I	39	$35,5 \pm 17,7$	$0,39 \pm 0,18$	$46,6 \pm 16,7$	$0,56 \pm 0,23$
II	36	$29,3 \pm 13,4$	$0,42 \pm 0,21$	$43,2 \pm 14,2$	$0,58 \pm 0,22$
P (I : II)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Примітка. ЦХК – цитохімічний коефіцієнт.

Таблиця 2. Показники функціональної активності еозинофільних гранулоцитів крові у дітей груп порівняння, визначені за допомогою НСТ-тесту

Клінічні групи	Кількість дітей	Показники НСТ-тесту			
		Спонтанного		Стимульованого	
		Частка формазан-позитивних клітин, %	ЦХК, у. о.	Частка формазан-позитивних клітин, %	ЦХК, у. о.
I	39	17,4 ± 2,02	0,21 ± 0,03	18,06 ± 1,95	0,2 ± 0,02
II	36	14,0 ± 1,67	0,20 ± 0,02	13,3 ± 1,3	0,17 ± 0,02
P (I : II)		> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

ної активності клітин, у пацієнтів із тяжкою БА був дещо вищим, ніж у хворих на середньотяжку БА. Отримані дані можуть свідчити про те, що при розвитку фенотипу тяжкої БА у дітей метаболічна активність нейтрофільних гранулоцитів значно вища, ніж при її середньотяжкому варіанті.

Отже, у дітей із фенотипом тяжкої БА нейтрофільні гранулоцити крові були більш метаболічно активними, однак їхні резервні можливості були зниженими порівняно з хворими на середньотяжку БА. Це збігається із даними літературних повідомлень останніх років [13, 16].

Киснезалежну метаболічну активність еозинофілів крові визначали також за даними НСТ-тесту в спонтанному та стимульованому варіантах, результати якого наведені у **таблиці 2**.

Хоча статистично вірогідних відмінностей за середньогруповими показниками НСТ-тесту з еозинофілами крові між групами порівняння виявити не вдалося, у дітей із фенотипом тяжкої БА відзначено тенденцію до активації здатності клітин до *респіраторного вибуху* за даними спонтанного та стимульованого НСТ-тесту. Частка дітей із тяжкою БА, в яких показники стимульованого НСТ-тесту з еозинофілами (за даними ЦХК) перевищували середньогрупове значення (0,2 у. о.), сягала 12,5 ± 3,2%, а серед хворих на середньотяжку БА такі значення траплялися лише у 6,8 ± 1,6% випадків, що майже наполовину менше (p < 0,05). Отримані результати можна пояснити тим, що при розвитку тяжкої БА головні прозапальні клітини алергічного запалення (еозинофіли) є більш активними, ніж за середньотяжкого перебігу захворювання.

Таблиця 3. Показники фагоцитарної функції еозинофільних гранулоцитів крові дітей груп порівняння

Клінічні групи	Показники фагоцитозу		
	Кількість дітей	Фагоцитарна активність, %	Фагоцитарне число, у. о.
I	24	69,8 ± 2,8	3,5 ± 0,5
II	22	74,0 ± 2,4	5,3 ± 0,9
P (I : II)		> 0,05	> 0,05

На основі отриманих даних визначено показники діагностичної цінності результатів стимульованого НСТ-тесту з еозинофільними гранулоцитами, які перевищують 0,2 у. о. (ЦХК), для верифікації фенотипу тяжкої БА при диференціації з її середньотяжким варіантом.

Установлено, що специфічність тесту сягала 93,2%, а відносний ризик наявності фенотипу тяжкої БА при підвищених результатах стимульованого НСТ-тесту з еозинофілами периферичної крові (> 0,2 у. о.) становив 1,95 (95% ДІ 0,7-5,2), співвідношення шансів – 1,3 (95% ДІ 0,5-3,2), атрибутивний ризик – 0,16. Отже, цей діагностичний тест можна використовувати в комплексі з іншими клінічно-параклінічними даними для *верифікації тяжкого варіанту БА у дітей*, що сприятиме поліпшенню вибору тактики індивідуалізованого лікування та пришвидшенню досягнення контролю над захворюванням.

При аналізі показників *резерву НСТ-тесту еозинофільних лейкоцитів* периферичної крові встановлено, що у дітей із фенотипом тяжкої БА він становив 0,74 ± 0,9 у. о., а у хворих групи порівняння – 1,04 ± 1,1 у. о. (p > 0,05). Тобто у представників основної групи резервні можливості еозинофільних гранулоцитів крові також були зниженими та скомпрометованими, порівнюючи з дітьми, хворими на середньотяжку БА. Це можна пояснити тривалою алергенною стимуляцією досліджуваних клітин, що притаманно розвитку фенотипу тяжкої БА.

Проведено оцінку *фагоцитарної активності еозинофільних гранулоцитів* крові у представників груп спостереження, результати якої наведені в **таблиці 3**.

Із представлених даних видно, що хоча фенотип тяжкої БА асоціюється з підвищенням метаболічної активності еозинофілів крові (за даними НСТ-тесту), проте їхні фагоцитарні функції, як і резервні метаболічні можливості (за даними показників резерву та індексу стимуляції НСТ-тесту еозинофілів крові), є пригніченими. Цей факт може бути пояснений тим, що при тяжкій БА еозинофіли крові зазнають більш вагомого та тривалого алергенного навантаження, що призводить до їхньої функціональної виснаженості.

За даними сучасних літературних джерел, пошкоджувальна дія еозинофільних та нейтрофільних

поліморфноядерних лейкоцитів реалізується за рахунок дегрануляції та викиду у позаклітинний простір специфічних агресивних речовин, до яких належать катіонні білки та пероксидаза [3, 4, 6]. Тому вважали доцільним визначення внутрішньоклітинного вмісту зазначених речовин у нейтрофільних та еозинофільних гранулоцитах крові дітей груп порівняння. Отримані показники оцінювали щодо їхньої клінічної значущості для виявлення важкого варіанту БА. У представників обох груп спостереження не виявлено суттєвої різниці за показниками середнього вмісту *нейтрофільних* (НКБ) та *еозинофільних катіонних білків* (ЕКБ) та рівня *активності нейтрофільної* (НП) та *еозинофільної пероксидази* (ЕП). У дітей, хворих на тяжку БА, внутрішньоклітинний вміст НКБ становив $0,16 \pm 0,06$ у. о., а у пацієнтів із середньотяжкою БА – $0,2 \pm 0,03$ у. о. ($p > 0,05$). Рівень активності НП становив $1,3 \pm 0,04$ та $1,2 \pm 0,02$ у. о. відповідно ($p > 0,05$). У хворих основної групи внутрішньоклітинний вміст ЕКБ та рівень активності ЕП сягали $0,17 \pm 0,03$ та $1,29 \pm 0,2$ у. о. відповідно, а у дітей групи порівняння – $0,26 \pm 0,05$ та $1,44 \pm 0,12$ у. о. відповідно ($p > 0,05$).

Попри відсутність вірогідної різниці за середніми значеннями, у хворих I групи внутрішньоклітинний вміст ЕКБ був у 1,5 разу меншим, ніж у пацієнтів групи порівняння, що свідчить на користь підвищеного рівня дегрануляції та виснаженості цих прозапальних клітин за наявності фенотипу тяжкої БА у дітей при підвищеній потребі у цитотоксичності за рахунок активної дегрануляції.

Виходячи з наведених вище даних, вважалося доцільним визначення діагностичної цінності для верифікації фенотипу тяжкої БА у дітей *комплексного показника*, який об'єднує результати:

- спонтанного НСТ-тесту з еозинофілами крові (ЦХК $> 0,2$ у. о.);
- визначення фагоцитарної активності цих гранулоцитів ($< 60\%$);
- визначення внутрішньоклітинного вмісту еозинофільних катіонних протеїнів ($< 0,15$ у. о.).

Так, чутливість цього комплексного параклінічного тесту становила 75%, специфічність – 64%, позитивна та негативна передбачувана цінність – 67,5 та 72% відповідно; відносний ризик наявності фенотипу тяжкої БА при реєстрації зазначеного комплексного показника метаболічної та функціональної активності еозинофілів крові становив 5,3 (95% ДІ 2,9-9,8), співвідношення шансів – 2,4 (95% ДІ 1,8-3,2), атрибутивний ризик – 0,4.

Таким чином, при розвитку фенотипу тяжкої бронхіальної астми у дітей метаболічна активність головних прозапальних клітин алергічного запалення – еозинофілів крові, – за даними НСТ-тесту, зростає. Проте зменшується вміст внутрішньоклітинних медіаторів алергічного запалення (ймовірно, через деструкцію ацидофільних гранул), а також знижуються функціональна здатність (за даними фагоцитарної активності та фагоцитарного числа) і резервні можливості (за даними резерву НСТ-тесту) цих клітин. Отримані результати, на нашу

думку, повинні оптимізувати ефективність комплексної клінічно-параклінічної діагностики фенотипу тяжкої БА у дітей. У випадках недосягнення контролю над захворюванням стає можливим виокремлення хворих із фенотипом тяжкої астми за допомогою запропонованих тестів.

Висновки

1. При розвитку фенотипу тяжкої БА у дитячому віці відзначається тенденція до збільшення показників киснезалежного метаболізму еозинофільних та нейтрофільних гранулоцитів крові (за даними спонтанного НСТ-тесту) з одночасним зменшенням їхньої функціональної здатності (за показниками внутрішньоклітинного вмісту еозинофільних та нейтрофільних катіонних білків).

2. У разі виявлення комплексного параклінічного показника, що включає результати спонтанного НСТ-тесту з еозинофілами крові (ЦХК $> 0,2$ у. о.), визначення фагоцитарної активності еозинофілів крові ($< 60\%$) та внутрішньоклітинного вмісту еозинофільних катіонних протеїнів ($< 0,15$ у. о.), ризик розвитку фенотипу тяжкої БА збільшується в 2,4 разу.

3. При реєстрації зниження фагоцитарної активності еозинофільних гранулоцитів крові, зокрема показників ФА $< 63\%$ та ФЧ $< 2,0$ у. о., ризик розвитку бронхіальної астми фізичного напруження збільшується в 2,7 разу.

Література

1. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Ларькова И.А. Респираторные аллергические заболевания у детей / В кн.: Иммуноterapia: руководство для врачей / Под ред. Р.М. Хаитова, Р.И. Атауллаханова. М.: Гэотар-Медиа, 2011. – 672 с.
2. Булгакова В.А. Фармакотерапия обострений бронхиальной астмы у детей / В.А. Булгакова, И.И. Балаболкин // Практика педиатра – 2013. – май-июнь. – С. 10-15.
3. Вишнева Е.А. Современные подходы к терапии бронхиальной астмы у детей / Е.А. Вишнева, Л.С. Намазова-Баранова, А.А. Алексеева, К.Е. Эфендиева, Л.Р. Селимзянова, Е.А. Промыслова // Медицинский совет. – № 1. – 2014. – С. 45-50.
4. Геппе Н.А. Бронхиальная астма у детей. Направления в совершенствовании ведения пациентов / Н.А. Геппе // Медицинский совет. – № 11. – 2013. – С. 26-32.
5. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Г. Лора-младшего, Т. Фишера, Д. Адельмана. Пер. с англ. – М.: Практика, 2000.
6. Костроміна В.П. Особливості перебігу бронхіальної астми залежно від віку дитини та давності захворювання / В.П. Костроміна, О.О. Речкіна, Л.Б. Ярошук, В.О. Стриж, К.О. Мельник, А.С. Дорошенко // Астма та алергія. – № 4. – 2013. – С. 11-15.
7. Кузьменко Л.Г. Гетерогенність бронхіальної астми в дитячому вістві / Л.Г. Кузьменко, В.Ю. Меркулова, В.К. Котлюков, Н.И. Петрук, Т.В. Брилькова, Р.А. Корнюшин, О.В. Быстрова // Педиатрия. – 2013. – Т. 92, № 3. – С. 28-32.
8. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса. – М.: Мир, 1990.
9. Маянский А.Н., Пикуза О.И. Клинические аспекты фагоцитоза. Казань: Магариф, 1993.
10. Огородова Л.М. Тяжелая бронхиальная астма у детей: результаты многоцентрового национального исследования «НАБАТ» / Л.М. Огородова, Ф.И. Петровский, Д.С. Коростовцев, О.А. Аликова // Аллергология. – 2004. – № 3 – С. 3-9.
11. Самигуллина Н.В. Основные предикторы формирования бронхиальной астмы у детей / Н.В. Самигуллина, Р.М. Файзуллина // Fundamental research. – 2013. – № 7. – P. 170-173.
12. Chung K.F. International ERS/ATS guidelines on definition, evaluation and treatment of severe asthma / K.F. Chung // Eur Respir J. – 2013. – Dec 12. – P. 138-143.
13. Feshchenko Y.I. Physical activity of patients suffering from a mild form of bronchial asthma / Y.I. Feshchenko, N.A. Prymushko, L.M. Kuryk, V.V. Kuts, O.I. Adamchuk, I.P. Turchyna, O.A. Kanarskyi, O.I. Krylach // Астма та алергія. – № 1. – 2014. – С. 5-12.
14. Fletcher R.H. Clinical epidemiology – the essentials / R.H. Fletcher S.W. Fletcher, E.H. Wagner // William & Wilkins, Baltimore / London. – 1982. – 223 p.
15. GINA-Report-2012 [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://ginaasthma.org>.
16. Kostromina V.P. Risk factors of bronchial asthma in children / V.P. Kostromina, O.O. Rechkina, K.O. Melnik, A.S. Doroshenkova, V.O. Strizh, L.B. Yaroshchuk // Астма та алергія. – 2013. – № 2. – С. 21-23.