

## Нейтрофильная эластаза ротовой жидкости у детей с бронхиальной астмой

Е.С. Минина, В.И. Новикова, П.Д. Новиков

Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

### Oral neutrophilic elastase in children with bronchial asthma

E.S. Minina, V.I. Novikova, P.D. Novikov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

#### Аннотация

*Цель исследования.* Оценка уровня функциональной активности и концентрации нейтрофильной эластазы (НЭ) у пациентов с бронхиальной астмой (БА).

*Материалы и методы.* В исследование были включены 58 детей 5-16 лет с аллергической (n=35) и смешанной (n=23) формами БА, 31 ребенок 7-17 лет контрольной группы (без аллергопатологии). В ходе исследования оценивали функциональную активность (с использованием субстрата гранулоцитарной эластазы человека GIp-Pro-Val-pNA) и концентрацию (иммуноферментный анализ) нейтрофильной эластазы в ротовой жидкости.

*Результаты.* У пациентов со смешанной формой БА при поступлении в стационар не было выявлено статистически значимой корреляции функциональной активности и концентрации НЭ ( $r=-0,015$ ,  $p>0,05$ ). После лечения в стационаре соотношение в группе БА (обе формы БА) приблизилось к таковой в контрольной группе (БА:  $r=0,475$ , аллергическая форма БА  $r=0,502$ , смешанная форма БА  $r=0,459$ ; контрольная группа:  $r=0,507$ ;  $p<0,05$ ).

*Заключение.* Определение функциональной активности и количественного уровня НЭ с последующей оценкой системы протеолиз-антипротеолиз возможно рассматривать, как маркер смешанной формы БА и эффективности различных вариантов базисной терапии заболевания.

#### Ключевые слова

Бронхиальная астма, нейтрофильная эластаза, ротовая жидкость.

#### **Введение**

Бронхиальная астма (БА) представляет собой одно из самых распространенных заболеваний у пациентов аллергологического профиля. Отмечается ежегодный прирост количества пациентов

#### Summary

*Objective.* Assessment of the level of functional activity and concentration of neutrophil elastase (NE) in patients with bronchial asthma (BA).

*Methods.* The study involved 58 children 5-16 years old with allergic (n=35) and mixed (n=23) forms of BA, 31 children 7-17 years old of the control group (without allergic pathology). During the study, the functional activity (using human granulocyte elastase substrate GIp-Pro-Val-pNA) and the concentration (enzyme-linked immunosorbent assay) of neutrophil elastase in the oral fluid were assessed.

*Results.* In patients with mixed BA on admission to the hospital, no statistically significant correlation was found between functional activity and concentration of NE ( $r=-0,015$ ,  $p>0,05$ ). After the treatment, the ratio in the BA group (both forms of BA) approached that in the control group (BA:  $r=0,475$ , allergic BA  $r=0,502$ , mixed BA  $r=0,459$ ; control group:  $r=0,507$ ;  $p<0,05$ ).

*Conclusion.* Determination of the functional activity and quantitative level of NE with the subsequent assessment of the «proteolysis-antiproteolysis» system can be considered as a marker of the mixed form of BA and the effectiveness of various basic therapy of the disease.

#### Keywords

Bronchial asthma, neutrophil elastase, oral fluid.

всех возрастных групп с диагнозом БА, по оценкам Всемирной организации здравоохранения насчитывается более 300 миллионов человек с данной патологией [1]. Выделяют различные фенотипы БА [2], среди которых тяжелым течением

нием характеризуется нейтрофильный фенотип. Нейтрофилы, которые участвуют в воспалении дыхательных путей при данном фенотипе, играют важную роль в развитии обострений БА и ремоделировании дыхательных путей [3, 4].

Ключевыми ферментами нейтрофилов, которые участвуют в патогенезе БА, являются нейтрофильная эластаза (НЭ) и миелопероксидаза. Наиболее изучена роль миелопероксидазы при аллергической патологии [5, 6, 7]. Однако в последнее десятилетие активно изучается фермент НЭ, который относится к группе эластаз с протеолитической активностью [8, 9]. Ферменты данной группы участвуют в гидролизе эластина (фибрилярный белок соединительной ткани), формирующего эластичные волокна различных тканей организма. Выделяют 2 основные формы эластазы: панкреатическая, содержащаяся в ацинарных клетках экзокринной части поджелудочной железы, и нейтрофильная, которая находится в азурофильных цитоплазматических гранулах полиморфноядерных лейкоцитов (преимущественно в нейтрофилах), также ее незначительные концентрации определяются в моноцитах и Т-лимфоцитах. Помимо гидролитического действия в отношении эластина НЭ также участвует в деградации коллагена, матриксных белков, ламинина, фибронектина, протеогликанов [10]. Выделение НЭ из азурофильных гранул нейтрофилов в экстрацеллюлярное пространство происходит под влиянием различных стимулирующих факторов: цитокинов (фактора некроза опухоли  $\alpha$ , интерлейкина 8), липополисахаридов, фрагментов бактериальной стенки. Ключевым ингибитором НЭ является  $\alpha$ 1-антитрипсин. Также в литературе встречаются данные о роли микробных ингибиторов сериновых протеаз [11, 12].

НЭ по своим функциям выступает в качестве регулятора воспаления, ей присуще как провоспалительное действие, так и противовоспалительное. НЭ может стимулировать выработку провоспалительных интерлейкинов 6 и 8, колониестимулирующих факторов [8]. В свою очередь в ряде исследований была отмечена роль НЭ в препятствии адгезии нейтрофилов к поверхности эндотелия, снижении фагоцитоза [13].

Учитывая вариабельность эффектов НЭ в процессе воспаления, представляет интерес изучение не только ее количественной концентрации, но и функциональной активности, что поможет выявить дисбаланс в системе протеолиз-антипротеолиз и особенности клинической симптоматики и течения заболевания в целом.

Доступные иммунологические методы позволяют определить общий уровень НЭ, включая ту часть эластазы, активный центр которой заблокирован ингибитором [13]. Поэтому разработка методов определения функциональной активности НЭ в биологических жидкостях является актуальной.

В последнее время в научной среде и практическом здравоохранении отмечается заинтересованность в использовании в диагностических целях альтернативных крови биологических жидкостей, забор которых можно выполнить неинвазивно. Таковой является ротовая жидкость (РЖ), все шире используемая в неинвазивной диагностической практике. РЖ представляет собой совокупность слюны (вода, электролиты, белки, ферменты, гормоны и др.) и секрета слизистой оболочки рта. Слюна, как самостоятельная биологическая жидкость, так и в составе РЖ, может использоваться в качестве эффективного индикатора локальной и системной биологической активности [14]. При этом следует помнить, что уровень большинства компонентов слюны значительно ниже, чем таковой уровень в сыворотке крови [10]. Также для понимания потенциальной роли РЖ в диагностике аллергических заболеваний необходимо учитывать, что реакции немедленной гиперчувствительности при данных заболеваниях, например при БА, являются ответом слизистой оболочки на аллерген, в ходе чего происходит высвобождение медиаторов воспаления, цитокинов и др. [10].

Изучение функциональной активности и количественного уровня НЭ ротовой жидкости при БА позволит выявить новые аспекты патогенеза заболевания и разработать неинвазивные диагностические тесты для повышения качества оказания медицинской помощи пациентам детского возраста с БА. Все вышеизложенное обусловило актуальность проблемы и обоснованность проведения данного исследования.

### Материалы и методы

Было выполнено одноцентровое открытое проспективное исследование на базе УЗ «Витебский областной детский клинический центр» (ВОДКЦ), г. Витебск, Республика Беларусь. Проведенное исследование было одобрено комитетом по этике клинических испытаний учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (ВГМУ). Выполнялось в рамках внутриуниверситетского научного стартап-гранта для молодых ученых на 2021 г. ВГМУ.

В исследование были включены 58 детей 5-16 лет ( $11,4 \pm 2,9$  лет) с аллергической ( $n=35$ ) и смешанной ( $n=23$ ) формами БА, проходивших лечение в аллергологическом отделении ВОДКЦ, и контрольная группа из 31 ребенка 7-17 лет ( $11,5 \pm 2,6$  лет), проходивших реабилитацию в травматологическом отделении ВОДКЦ (без аллергопатологии). По степени тяжести и течению БА группа состояла преимущественно из персистирующей БА легкой степени тяжести (таблица 1).

Диагноз БА был выставлен на основании клинического протокола Республики Беларусь по диагностике и лечению аллергических заболеваний и обоснован на данных анамнеза, клинических проявлениях, лабораторном, инструментальном и аллергологическом обследованиях. Базисное медикаментозное лечение БА проводилось 37 детям (28 детей – иГКС в качестве монотерапии или в комбинации с  $\beta_2$ -агонистами длительного действия/ антилейкотриеновыми препаратами, 9 детей – монотерапия антилейкотриеновыми препаратами).

Материалом для исследования послужили образцы ротовой жидкости, забор осуществляли 4-х-кратно у пациентов с БА (при поступлении в стационар/ до проведения кожных скарификационных проб – КСП, через 30 минут после проведения КСП, через 24 часа после проведения КСП, при выписке из стационара), в контрольной группе забор материала выполнялся однократно при поступлении в стационар. Образцы ротовой жидкости (6-8 мл) центрифугировали при 8000 об/мин в течение 10 минут, далее пробы фильтровали через нейлоновые фильтры. После проведения центрифугирования и фильтрации образцы ротовой жидкости хранили при  $t=-20^\circ\text{C}$  до проведения лабораторного исследования.

В ходе исследования оценивали протеолитическую активность ротовой жидкости (эластазную) и количественно определяли концентрацию НЭ в исследуемых образцах.

В качестве субстрата для оценки протеолитической активности НЭ использовали субстрат гранулоцитарной эластазы человека Glp-Pro-Val-pNA (кат. № SCP0170-10mg, Sigma-Aldrich, США). Реакции ставили в полистироловых планшетах для иммуноферментного анализа. Определение эластазы проводили в 0,1 М трис-НСl буфере рН 7,5, содержащем 1 мМ субстрата при инкубации при  $t=37^\circ\text{C}$  в течение 4 ч, для проведения реакции использовали 100 мкл неразведенной РЖ.

Учет реакций проводили на многоканальном фотометре Ф300 (ОАО «Витязь», Республика Беларусь) при двухволновом измерении (405 нм / 620 нм). Полученные данные выражали в условных единицах (Ед), которые соответствовали единицам оптической плотности.

Определение количественной концентрации НЭ выполняли путем проведения иммуноферментного анализа с использованием тест-систем производства Elabscience (кат. № E-EL-H1946). Учет реакций проводили на многоканальном фотометре Ф300 (ОАО «Витязь», Республика Беларусь) при одноволновом измерении (450 нм). Полученные результаты выражали в нг/мл.

Статистический анализ данных производили с помощью программы Statistica 10.0. Проверку гипотез о виде распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Уилка. К количественным признакам, имеющим распределение, отличное от нормального, применяли непараметрические методы и использовали критерий Вилкоксона (при сравнении 2-х зависимых групп), критерий Манна-Уитни (при сравнении 2-х независимых групп). Данные исследования

**Таблица 1. Характеристика детей, включенных в исследование**

Показатель		Аллергическая форма БА (n=35)	Смешанная форма БА (n=23)	Контрольная группа (n=31)
Пол:	n (%)			
– мужской		25 (71,4%)	18 (78,3%)	14 (60,9%)
– женский		10 (28,6%)	5 (21,7%)	9 (39,1%)
Возраст, лет	M $\pm$ SD	11,8 $\pm$ 3,0	10,7 $\pm$ 2,7	11,5 $\pm$ 2,3
Степень тяжести и течение БА:	n (%)			–
– легкая интермиттирующая		7 (20,0%)	1 (4,4%)	
– легкая персистирующая		27 (77,1%)	15 (65,2%)	
– средняя персистирующая		1 (2,9%)	7 (30,4%)	
– тяжелая персистирующая		–	–	

представлены в виде среднего значения, медианы, интерквартильного размаха ( $M \pm SD$ , Me, [25;75]).

Для определения меры связи количественных параметров использовали корреляционный анализ ранговой корреляции Спирмена при отличном от нормального распределении с уровнем статистической значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

У наблюдаемых детей с аллергической и смешанной формами БА при проведении КСП была выявлена сенсibilизация к бытовым ( $n=39$ , 67,2%), эпидермальным ( $n=17$ , 29,3%), пыльцевым ( $n=4$ , 6,9%) и пищевым аллергенам ( $n=5$ , 8,6%). Среди группы бытовых аллергенов наиболее часто встречалась сенсibilизация к домашней пыли и перу подушки, среди группы эпидермальных аллергенов – шерсть кошки и шерсть собаки.

В ходе проведения исследования не было выявлено статистически значимых различий исходных уровней функциональной активности и концентрации НЭ у пациентов с БА и в контрольной группе (таблица 2).

Анализ показателей функциональной активности НЭ в выбранные нами временные точки показал статистически значимое снижение уров-

ня эластазной активности после проведения КСП (через 30 минут) (таблицы 3, 4).

Снижение функциональной активности НЭ в ротовой жидкости после проведения провокации аллергеном может объясняться физиологическими особенностями реализации комплекса «стресс-адаптация» на молекулярно-клеточном уровне, что, в свою очередь, требует последующего детального изучения.

Проведенный корреляционный анализ выявил более сильную зависимость уровней функциональной активности НЭ и ее концентрации у детей контрольной группы ( $r=0,507$ ,  $p < 0,05$ ). У пациентов со смешанной формой БА при поступлении в стационар статистически значимой корреляции этих показателей не было выявлено ( $r=-0,015$ ,  $p > 0,05$ ). После лечения в стационаре соотношение в группе БА (обе формы БА) приблизилось к таковой в контрольной группе (БА  $r=0,475$ , аллергическая форма БА  $r=0,502$ , смешанная форма БА  $r=0,459$ ;  $p < 0,05$ ) (таблица 5).

### Заключение

У пациентов с БА при оценке функциональной активности и концентрации нейтрофильной эластазы ротовой жидкости наблюдается дисбаланс системы протеолиз-антипротеолиз, особенно

**Таблица 2. Исследуемые показатели в группе БА и контрольной группе, Me [Q25; Q75]**

Показатель	БА $n=58$	Контрольная группа $n=31$	$p$
Эластазная активность, Ед	0,067 [0,048; 0,105]	0,061 [0,025; 0,095]	0,068
Нейтрофильная эластаза, нг/мл	3,828 [1,512; 18,832]	2,119 [0,536; 15,476]	0,241

Примечание:  $p$  – критерий Манна-Уитни

**Таблица 3. Уровни эластазной активности в группе БА в различные временные точки, Ед, Me [Q25; Q75]**

Временные точки сравнения	1	2	3	$p$
	БА ( $n=58$ )	Аллергическая форма БА ( $n=35$ )	Смешанная форма БА ( $n=23$ )	
При поступлении в стационар / выписке из стационара	0,067 [0,048; 0,105] / 0,056 [0,038; 0,086]	0,066 [0,045; 0,100] / 0,061 [0,040; 0,090]	0,074 [0,057; 0,106] / 0,054 [0,037; 0,079]	$p_1=0,150$ $p_2=0,489$ $p_3=0,144$
До проведения КСП / через 30 минут после проведения КСП	0,066 [0,048; 0,105] / 0,050 [0,034; 0,075]	0,066 [0,045; 0,100] / 0,047 [0,032; 0,062]	0,066 [0,049; 0,106] / 0,057 [0,044; 0,092]	$p_1=0,001$ $p_2=0,014$ $p_3=0,015$
До проведения КСП / через 24 часа после проведения КСП	0,066 [0,048; 0,105] / 0,051 [0,035; 0,085]	0,066 [0,045; 0,100] / 0,056 [0,033; 0,085]	0,066 [0,049; 0,106] / 0,046 [0,036; 0,121]	$p_1=0,204$ $p_2=0,334$ $p_3=0,590$

Примечание:  $p$  – критерий Вилкоксона

**Таблица 4. Уровни нейтрофильной эластазы в группе исследования в различные временные точки, нг/мл, Me [Q25; Q75]**

Временные точки сравнения	1	2	3	p
	БА (n=58)	Аллергическая форма БА (n=35)	Смешанная форма БА (n=23)	
При поступлении в стационар / выписке из стационара	3,828 [1,512; 18,832] / 4,978 [1,710; 19,416]	3,088 [0,943; 19,180] / 5,872 [1,531; 21,905]	5,551 [2,066; 18,832] / 4,900 [1,844; 19,416]	p <sub>1</sub> =0,896 p <sub>2</sub> =0,569 p <sub>3</sub> =0,685
До проведения КСП / через 30 минут после проведения КСП	4,384 [1,512; 18,832] / 2,931 [0,917; 10,476]	3,619 [1,379; 19,180] / 2,732 [0,927; 11,205]	5,551 [1,853; 18,832] / 3,130 [0,600; 8,823]	p <sub>1</sub> =0,063 p <sub>2</sub> =0,245 p <sub>3</sub> =0,191
До проведения КСП / через 24 часа после проведения КСП	4,384 [1,512; 18,832] / 4,311 [1,001; 13,130]	3,619 [1,379; 19,180] / 2,879 [0,854; 12,145]	5,551 [1,853; 18,832] / 6,103 [1,428; 21,091]	p <sub>1</sub> =0,789 p <sub>2</sub> =0,471 p <sub>3</sub> =0,605

Примечание: p – критерий Вилкоксона

**Таблица 5. Корреляции уровней эластазной активности и нейтрофильной эластазы ротовой жидкости**

Временные точки сравнения	БА (n=58)	Аллергическая форма БА (n=35)	Смешанная форма БА (n=23)	Контрольная группа
При поступлении в стационар	r=0,249 p>0,05	r=0,353 p<0,05	r=-0,015 p>0,05	r=0,507 p<0,05
До проведения КСП	r=0,353 p<0,05	r=0,422 p<0,05	r=0,220 p>0,05	–
Через 30 минут после проведения КСП	r=0,469 p<0,05	r=0,447 p<0,05	r=0,465 p<0,05	–
Через 24 часа после проведения КСП	r=0,418 p<0,05	r=0,364 p<0,05	r=0,455 p<0,05	–
При выписке из стационара	r=0,475 p<0,05	r=0,502 p<0,05	r=0,459 p<0,05	–

Примечание: корреляция Спирмена

выраженный при смешанной форме БА, что свидетельствует о том, что при БА наблюдается ингибирование активности нейтрофильной эластазы без изменения ее количественного уровня. Возможно выраженный дисбаланс данной системы у пациентов со смешанной формой БА связан с наличием не только индуцирующего влияния аллергенов, но и

инфекционной зависимости (вирусной, бактериальной). Определение функциональной активности и количественного уровня нейтрофильной эластазы с последующей оценкой системы протеолиз-антипротеолиз возможно рассматривать, как маркер смешанной формы БА и эффективности различных вариантов базисной терапии заболевания.

## Литература

1. Всемирная организация здравоохранения. Астма. Режим доступа 22.08.2021: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/asthma>.
2. Global initiative for asthma. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2020. Режим доступа 22.08.2021: <https://ginasthma.org/reports/>.
3. Jatakanon A. et al. Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 60: 1532–1539.
4. Samitas K. et al. Upper and lower airway remodelling mechanisms in asthma, allergic rhinitis and chronic rhinosinusitis: The one airway concept revisited. *Allergy*. 2018; 73(5): 993–1002.
5. Карпук И.Ю., Новиков Д.К. Увеличение уровня миелопероксидазы в ротовой жидкости после орально-буккальной провокации с компонентами стоматологических материалов у пациентов с их непереносимостью. *Российский иммунологический журнал*. 2017; 4: 647–654.

6. Новиков Д.К. и др. Трансбуккальный метод диагностики аллергии по увеличению пероксидазной активности в слюне. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2015; 4: 35–43.
7. Шурок И.Н. Биомаркеры ротовой жидкости после провокационной орально-фарингеальной пробы с аллергеном для диагностики атопической бронхиальной астмы. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2018; 4: 82–86.
8. Kampe M. et al. Patients with allergic rhinitis and allergic asthma share the same pattern of eosinophil and neutrophil degranulation after allergen challenge. *Clinical and Molecular Allergy*. 2011; 9: 3.
9. Кабанова А.А. и др. Эластазная активность ротовой жидкости пациентов с гнойновоспалительными процессами челюстно-лицевой области. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2014; 2 (30): 68–75.
10. Шурок И.Н. Основные фенотипы и биомаркеры бронхиальной астмы. *Иммунопатология, аллергология, инфектология*. 2020; 2: 50–57.
11. Nagi Z.A. et al. Ecotin, a microbial inhibitor of serine proteases, blocks multiple complement dependent and independent microbicidal activities of human serum. *PLoS Pathog*. 2019; 15(12): e1008232.
12. Harish B.S. et al. Microbial serine protease inhibitors and their therapeutic applications. *Int J Biol Macromol*. 2018; 107: 1373–1387.
13. Аверьянов А. В, Поливанова А. Э. Нейтрофильная эластаза и болезни органов дыхания. *Пульмонология*. 2006; 5: 74–79.
14. Chiappin S. et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*. 2007; 383(1-2): 30–40.

#### Сведения об авторах:

Минина Е.С. – к.м.н., ассистент кафедры педиатрии №1, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет. E-mail: minina.e.s@mail.ru  
Новикова В.И. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии ПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.  
Новиков П.Д. – д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК и ПК, Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Поступила 22.08.2021 г.