

© І. Ф. Ільїнська, Ю. І. Фещенко, Л. М. Курик, Л. В. Ареф'єва, Ю. О. Матвієнко (10 серпня 2020). порушення індукції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів у хворих на бронхіальну астму та його значення в прогнозуванні її неконтрольованого перебігу [Електронний ресурс]. Режим доступу <http://www.ifp.kiev.ua/original/2020/ilyinskaya2020.pdf>

І. Ф. Ільїнська, Ю. І. Фещенко, Л. М. Курик, Л. В. Ареф'єва, Ю. О. Матвієнко
**ПОРУШЕННЯ ІНДУКЦІЇ ДЕКСАМЕТАЗОНОМ АКТИВАЦІЙНОГО
АПОПТОЗУ ЛІМФОЦИТІВ У ХВОРИХ НА БРОНХІАЛЬНУ АСТМУ
ТА ЙОГО ЗНАЧЕННЯ В ПРОГНОЗУВАННІ ЇЇ НЕКОНТРОЛЬОВАНОГО
ПЕРЕБІГУ**

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського
Національної академії медичних наук України», м. Київ, Україна

Ключові слова: бронхіальна астма, прогнозування неконтрольованого перебігу, резистентність до глюкокортикостероїдів, проліферація лімфоцитів, апоптоз лімфоцитів.

Бронхіальна астма (БА) залишається глобальною та національною проблемою сьогодення, що обумовлено поширеністю цієї хвороби в світі (понад 300 млн. осіб) та Україні – $\geq 10,1$ % всього населення, зростанням глобального тягаря, пов'язаного із загостреннями і щоденними клінічними проявами цієї хвороби, який за останні 20 років зріс на 30,0 % [1, 2]. Серед хворих на БА частка пацієнтів з неконтрольованим перебігом хвороби може дорівнювати 60,0–80,0 %, вартість їхнього лікування сягає 60,0 % від усіх витрат, пов'язаних з астмою, а за показниками економічних збитків наближається або перевищує рівень видатків на пацієнтів з цукровим діабетом, цирозом печінки, шизофренією та хронічним обструктивним захворюванням легень [3]. Пацієнти з неконтрольованою БА мають більш значне зниження якості життя, суттєвіші порушення працездатності та у 1,52 рази більш значні фінансові витрати, ніж хворі з контрольованою БА.

У нинішніх умовах своєчасне прогнозування неконтрольованого перебігу БА набуває особливого значення: поява в арсеналі протиастматичних лікарських засобів, «таргетних» або «біологічних» препаратів суттєво розширює можливості терапії БА та досягнення бажаного контролю хвороби. Як правило, ці препарати призначаються при неефективності стандартної терапії хворим з незадовільним контролем хвороби. Причини, якими можна пояснити відсутність контролю БА, підрозділяються на ендогенні та екзогенні. До екзогенних чинників відносяться неадекватна базисна терапія, невірне уявлення пацієнта про свої можливості у досягненні контролю БА, низька комплаєнтність, перманентна дія тригерів. До ендогенних факторів відносяться генетично детерміновані індивідуально високі

темпи розвитку запалення, некерована гіперреактивність бронхів та зниження чутливості до протиастматичних препаратів. Ознаки терапевтичної резистентності до різних препаратів мають 10,0–25,0 % хворих з неконтрольованою БА, з них у кожного п'ятого пацієнта виявляється резистентність до глюкокортикостероїдів (ГКС) – стероїдорезистентна астма. Її діагностика *in vivo* триває 2 тижні: протягом цього часу пацієнту призначають преднізолон у дозі 40 мг на добу, і якщо після цього підвищення об'єму форсованого видиху за 1 сек (ОФВ₁) у відповідь на вдихання β_2 -агоніста не перевищує 15,0 % у хворого діагностують резистентність до ГКС [4].

Виявлення резистентності лімфоцитів хворих на БА до ГКС *in vitro* дозволяє заздалегідь спрогнозувати недостатню ефективність застосування цих ліків, уникнути їх необгрунтованого призначення, своєчасно провести корекцію терапії та попередити втрату контролю над бронхіальною астмою.

Визначення резистентності до ГКС *in vitro*, як правило, засноване на їх здатності викликати лізис лімфоцитів периферійної крові [5] або пригнічувати їх проліферативну відповідь на мітоген – фітогемаглютинін (ФГА) [6, 7] чи алерген [8].

Лейкоцитарний тест полягає у визначенні відносного та абсолютного вмісту у крові лімфоцитів, толерантних до літичної дії ГКС. У дорослих здорових осіб їх кількість складає 60,0–64,0 % чи 1100–1250 лімфоцитів в 1 мкл крові. При неконтрольованій БА відбувається суттєве збільшення фракції стероїдорезистентних (кортизолрезистентних або кортикостероїдрезистентних) лімфоцитів [5]. Нині лейкоцитарний тест вважається застарілим і в лабораторіях медичних установ практично не застосовується.

Найбільш поширеним у країнах пострадянського простору залишається спосіб визначення резистентності лімфоцитів до стероїдів *in vitro* в реакції бластної трансформації лімфоцитів (РБТЛ) з морфологічним обліком результатів [6, 9]. Для цього проводять інкубацію 100 мкл цільної гепаринізованої венозної крові або отриманої після її відстоювання лейкосуміші, відповідно у 5,0 мл або 2,0 мл повного поживного середовища (середовище 199 з сироваткою крупної рогатої худоби та антибіотиками) протягом 5 діб при 37° С: без додавання будь-яких стимуляторів проліферації (для визначення спонтанної проліферації), у присутності стандартного Т-клітинного мітогену фітогемаглютиніну (ФГА) у кінцевій дозі 12 мкг/мл та у присутності ФГА і дексаметозану (ДМ) у кінцевій дозі 0,4 мкг/мл. По завершенні інкубації супернатант видаляють, осадки обробляють оцтовою кислотою (5 мл 10 % розчину), центрифугують 5 хвилин при 1500 об/хв., супернатант видаляють, а оброблені осадки переносять на предметні скельця, висушують, фіксують метанолом та проводять фарбування отриманих препаратів за Романовським-Гімза. В

кожному препараті під імерсією підраховують по 300 лімфоцитів, у т.ч. з бластною морфологією та розраховують відсоток останніх. Проліферативну відповідь лімфоцитів на ФГА визначають як різницю між відсотком бластних клітин у пробі з ФГА та у пробі без нього, так само визначають проліферативну відповідь лімфоцитів на ФГА у присутності дексаметазону, після чого розраховується індекс пригнічення дексаметазоном проліферативної відповіді лімфоцитів на ФГА за формулою:

$$I_{\text{ДМ}} = P_{\text{ФГА+ДМ}} / P_{\text{ФГА}} \text{ (у. о.)}, \quad (1)$$

де $I_{\text{ДМ}}$ – індекс пригнічення дексаметазоном проліферативної відповіді Лф на ФГА;

$P_{\text{ФГА+ДМ}}$ – проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА у присутності дексаметазону;

$P_{\text{ФГА}}$ – проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА.

При $I_{\text{ДМ}}$ менше 0,40 інгібуючий вплив ДМ на проліферативну відповідь лімфоцитів на ФГА вважають високим, при $I_{\text{ДМ}}$ від 0,40 до 0,75 – помірним, і низьким – при $I_{\text{ДМ}}$ понад 0,75, що притаманне стероїдорезистентності, за наявності якої прогнозується неконтрольований перебіг БА. [9]. Тривалість проведення цього дослідження сягає 5–7 діб, а через суб'єктивність мікроскопічної оцінки результатів, якість якої значною мірою залежить від кваліфікації дослідника, точність здійснення прогнозу залишається невисокою.

Це спонукало запропонувати спосіб прогнозування неконтрольованого перебігу бронхіальної астми, в якому виявлення *in vitro* резистентності Лф хворих на БА до ГКС проводиться за відсутністю індукції (інгібіцією) дексаметазоном активаційного апоптозу цих клітин.

Відомо, що протизапальна дія ГКС реалізується багатьма механізмами, серед яких головними виступають:

- інгібіція проліферативної відповіді лімфоцитів (Лф) на мітогени, що призводить до пригнічення продукції антиген (алерген)-реактивних клітин;
- сприяння їх апоптозу, що призводить до елімінації ефекторів запального процесу [10].

Апоптоз – одна з форм програмованої (генетично детермінованої) клітинної смерті з характерними морфологічними і біохімічними ознаками, серед яких накопичення фосфатиділсерину в зовнішньому моношарі цитоплазматичної мембрани, конденсація хроматину, фрагментація ДНК, розпад клітин на апоптозні тільця та їх усунення макрофагами є найбільш значущими. Хоча терміни «апоптоз» та «програмована клітинна смерть» зазвичай використовуються як синоніми, насправді «програмована клітинна смерть»

це сукупність (каскад) послідовних та складних біохімічних процесів, які відбуваються в клітині, а «апоптоз» їх морфологічне втілення [11]. Чисельними дослідженнями минулих років було доведено, що зрілі неактивовані Лф резистентні до апоптозу, але він відбувається при активації цих клітин [12, 13]. Саме тому вивчення екзогенної індукції апоптозу Лф різними агентами (інфекційними, хімічними, метаболічними, лікарськими препаратами тощо) як правило, здійснюють після попередньої активації цих клітин [13, 14].

За даними літератури при бронхіальній астмі спостерігається посилення ГКС-індукованого апоптозу Лф у хворих з чутливістю лімфоцитів до стероїдів [13, 15], а у стероїдорезистентних пацієнтів індукція дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів відсутня.

Тому для виявлення резистентності лімфоцитів до стероїдів *in vitro* оцінюють вплив дексаметазону на лімфоцити, активовані фітогемаглютиніном, для чого підраховують відсоток лімфоцитів з ознаками апоптозу методом проточної цитометрії з подальшим розрахунком індексу інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів і при значенні індексу інгібіції 1,0 та менше визначають стероїдорезистентність лімфоцитів і прогнозують неконтрольований перебіг бронхіальної астми.

Спосіб здійснюють наступним чином.

По 500 мкл гепаринізованої крові хворого вміщують у 2 пластикові пробірки ємністю 1,5–2,0 мл. У першу пробірку, яка призначена для визначення показника активаційного апоптозу, додають 400 мкл повного поживного середовища RPMI (з L-глутаміном, NEPEs і 1,0 % гентаміцину) та 100 мкл ФГА, розведеного до кінцевої концентрації 12,5 мкг/мл (для приготування робочого розчину до 0,25 мл рідкого ФГА додають 1,25 мл повного поживного середовища). У другу пробірку, яка призначена для визначення впливу дексаметазону (ДМ) на активаційний апоптоз лімфоцитів, додають 300 мкл повного поживного середовища, 100 мкл розведеного ФГА та 100 мкл розчину дексаметазону у робочому розведенні 0,4 мкг/мл (для чого дексаметазон розводять повним поживним середовищем у 100 разів). Пробірки щільно коркують та інкубують 48 годин при температурі 38° С. По завершенні інкубації проби центрифугують 10 хвилин при 100 g і температурі 4° С, відмивають льодяним поживним середовищем та тримають пробірки в ємності з льодом. Після цього для виявлення лімфоцитів з ознаками апоптозу проводять їх фарбування люмінесцентними фарбниками [16, 17]: анексином 5 (An-5), коньюгованим із флюоресцеїн ізотіоціанатом (FITC) для визначення відносного вмісту лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу за екстерналізацією фосфатиділсерину на цитоплазматичній мембрані клітин [18] та 7-аміно-актіноміцином-D (7-Amino Actinomycin D – 7AAD) для визначення відносного вмісту

лімфоцитів з пізними ознаками апоптозу – за пошкодженнями ДНК які відбуваються в ядрі клітин [19].

Для цього супернатант видаляють, з верхнього шару осаду відбирають 100 мкл та ресуспендують його в 200 мкл зв'язуючого буфера, розведеного у 10 разів. Після цього 50 мкл розведеної буфером крові переносять у пробірки для проточного цитофлюориметра, додають по 5 мкл An-5- FITC та по 10 мкл 7AAD, інкубують 15 хвилин у холодильнику в ємності з льодом, після чого додають по 200 мкл зв'язуючого буфера, витримують 10 хвилин у холодильнику в ємності з льодом, лізують 2 мл стандартного лізуючого розчину 15 хвилин в темряві та проводять проточну цитометрію проб. У кожній пробі визначають відсоток лімфоцитів з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–), з ранніми та пізними ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) і пізними ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+). Визначають їх суму – показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) та розраховують індекс інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів (Пдм) за формулою:

$$\text{Пдм} = \frac{\text{ПаЛф ФГА+ДМ}}{\text{ПаЛф ФГА}} \text{ у. о.} \quad (2)$$

де: Пдм – індекс інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів;

ПаЛф ФГА+ДМ – показник активаційного апоптозу лімфоцитів у присутності дексаметазону (%);

ПаЛф ФГА – показник активаційного апоптозу лімфоцитів (%),

і при значенні індексу інгібіції активаційного апоптозу лімфоцитів 1,0 та менше визначають стероїдорезистентність лімфоцитів і прогнозують неконтрольований перебіг бронхіальної астми.

Для ілюстрації наводимо декілька прикладів визначення стероїдорезистентності двома описаними вище способами.

Приклад 1.

Хвора Л-а О. О., жінка 45 років, з діагнозом: персистуюча контрольована БА середньої тяжкості з фіксованою бронхообструкцією. Серед тригерів зафіксовані: контакт з алергенами, психоемоційне напруження, фізичне навантаження, періодичне порушення призначеної терапії. Має полівалентну алергію: на шерсть вівці і кролика, домашній і бібліотечний пил, амброзію, траву костер.

При імунологічному обстеженні пацієнтки при визначенні резистентності лімфоцитів до стероїдів за інгібіцією проліферації Лф були отримані наступні результати:

проліферативна відповідь Лф на ФГА дорівнювала 69,0 %, проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА у присутності дексаметазону (ДМ) склала 48,5 %, індекс пригнічення (інгібіції) дексаметазоном проліферативної відповіді Лф на ФГА – 0,70, що свідчило про помірне зниження чутливості до стероїдів.

При визначенні резистентності лімфоцитів до стероїдів за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу Лф, були отримані такі результати: відсоток клітин з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–) склав 22,1 %, з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) склав 5,0 %, з пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+) – 1,6 %. Показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) дорівнював 28,7 %. При визначенні активаційного апоптозу лімфоцитів у присутності дексаметазону відсоток клітин з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–) склав 22,7 %, з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) склав 3,5 %, з пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+) склав 0,6 %. Показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) дорівнював 26,8 %. Розрахований індекс інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів склав 0,9 у. о. Це вказувало на наявність у хворої стероїдорезистентності, що підтверджувалося клінічно: застосуванням високих доз інгаляційних ГКС (Симбікорту 1280 мкг/добу) і свідчило про високу ймовірність втрати контролю над БА та необхідність корекції лікування.

Приклад 2.

Хвора Н-к Н. М., жінка 45 років з діагнозом: бронхіальна астма, тяжкий перебіг, неконтрольована. Коморбідна патологія: хронічний холецистит, гастрит, гіпертонічна хвороба, хронічний алергічний вазомоторний риніт із поліпами у носових пазухах. Серед тригерів зафіксовані: контакт з алергенами, психоемоційне напруження, фізичне навантаження, періодичне порушення призначеної терапії. Загострення, які потребують лікування у стаціонарі виникають 3–4 рази на рік. Має алергію на шерсть kota і собаки, домашнього кліща, бібліотечний пил. Постійно отримує Серетид 50/500 мкг по 1 вдиху 2 рази на добу, Сальбутамол 100 мкг за потребою. Преднізолон 15 мг постійно.

При імунологічному обстеженні пацієнтки при визначенні резистентності лімфоцитів до стероїдів за інгібіцією проліферації Лф були отримані наступні результати: проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА дорівнювала 62,0 %, проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА у присутності дексаметазону склала 57,0 %, індекс пригнічення дексаметазоном проліферативної відповіді Лф на ФГА – 0,92, що свідчило про резистентність лімфоцитів до стероїдів.

При визначенні резистентності лімфоцитів до стероїдів за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу Лф, були отримані такі результати: активаційний апоптоз – відсоток клітин з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–) склав 37,7 %, з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) склав 7,0 %, з пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+) – 11,3 %. Показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) дорівнював 60,3 %. При визначенні активаційного апоптозу лімфоцитів у присутності дексаметазону відсоток клітин з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–) склав 11,1 %, з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) – 5,2 %, з пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+) – 5,9 %. Показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) дорівнював 22,2 %. Розрахований індекс інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів склав 0,4 у. о. Це свідчило про наявність у хворої стероїдорезистентності, що співпадало з попереднім результатом і підтверджувалося клінічно відсутністю контролю БА попри призначення високих доз інгаляційних ГКС і постійним прийомом системних ГКС, частими загостреннями, які потребували госпіталізації.

Приклад 3.

Хворий Ш-в Д. В., чоловік, 38 років, хворіє на аспіринову бронхіальну астму майже 30 років, має загострення до 2 разів на рік, які вимагають стаціонарного лікування. Виявлена полівалентна харчова і медикаментозна алергія. Для контролю хвороби постійно отримує: Серетид 50/500 мкг по 1 вдиху 2 рази на добу, Сальбутамол 100 мкг за потребою.

При імунологічному обстеженні пацієнта при визначенні резистентності лімфоцитів до стероїдів за інгібіцією проліферації Лф були отримані наступні результати: проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА дорівнювала 68,0 %, проліферативна відповідь лімфоцитів на ФГА у присутності дексаметазону склала 48,0 %, індекс пригнічення дексаметазоном проліферативної відповіді Лф на ФГА – 0,73, що свідчило про помірне зниження чутливості лімфоцитів до стероїдів.

При визначенні показників активаційного апоптозу відсоток клітин з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–) склав 10,1 %, з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) дорівнював 7,3 %, з пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+) – 7,3 %. Показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) дорівнював 24,7 %. При визначенні активаційного апоптозу лімфоцитів у присутності дексаметазону відсоток клітин з ранніми ознаками апоптозу (An-5- FITC+/7AAD–) склав 19,8 %, з ранніми та пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC+/7AAD+) – 62,7 %, з пізніми ознаками апоптозу (An-5-FITC–/7AAD+) – 1,2 %. Показник лімфоцитів з ознаками апоптозу (ПаЛф) дорівнював 26,8 %.

Розрахований індекс інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів дорівнював 3,4 у. о. Це свідчило про чутливість лімфоцитів хворого до дексаметазону, через що був зроблений прогноз щодо контрольованості БА, яка була підтверджена клінічно.

Паралельно за цими двома способами було обстежено 24 хворих на БА з різною її контрольованістю: у т.ч. 10 осіб з контрольованою БА (1 чоловік та 9 жінок, середній вік 50,7 років \pm 3,6 років) та 14 пацієнтів з неконтрольованою БА (2 чоловіки та 12 жінок, середній вік 55,6 років \pm 3,8 років). Отримані результати порівнювали з клінічними даними. Частота визначення чутливості до дексаметазону *in vitro* та її підтвердження клінічними спостереженнями у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю наведені у табл. 1. Як свідчать представлені дані, у групі хворих з контрольованою БА резистентність лімфоцитів за інгібіцією дексаметазоном їх проліферації було виявлено у 3 осіб (30,0 %), а у решти 7 (70,0 %) пацієнтів було визначено помірне зниження чутливості лімфоцитів до дексаметазону. У той же час за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу, резистентність лімфоцитів до дексаметазону, яка свідчила про можливість втрати контролю над БА, була виявлена у 7 (70,0 %) осіб, а у 3-х хворих (30,0 %) відзначалася чутливість Лф до дексаметазону. За клінічними даними резистентність до стероїдів у цій групі хворих на БА мала місце у 6 випадках (60,0 %), тобто на 1 випадок менше, а стероїдочутливу БА за клінічними даними у цій групі було зафіксовано у 4 (40,0 %) випадках.

У хворих на неконтрольовану БА резистентність Лф до дексаметазону за інгібіцією їх проліферації була встановлена у 2-х хворих (14,3 %), а за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу Лф, резистентність була визначена у 9 пацієнтів (64,3 %). Клінічне підтвердження стероїдорезистентності у цій групі було отримано в 11 (78,6 %) випадках, а у 3-х осіб клінічно була діагностована стероїдочутлива БА.

Всього серед 24 хворих на БА резистентність Лф до дексаметазону за інгібіцією проліферації Лф була виявлена у 5 пацієнтів (20,8 %), а за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу цих клітин – у 16 хворих (66,7 %). Клінічні ознаки стероїдної резистентності були виявлені у 17 хворих на БА (78,6 %).

Проведений розрахунок чутливості способу визначення стероїдорезистентності за інгібіцією дексаметазоном проліферації Лф ($100 \cdot 5 / 17 = 29,4$ %), способу за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу Лф ($100 \cdot 16 / 17 = 94,1$ %). Різниця чутливості тестів $94,1$ % – $29,4$ % = $64,7$ % [20].

Таблиця 1 – Результати визначення чутливості до дексаметазону у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю

Показники чутливості до дексаметазону (ДМ) у хворих на бронхіальну астму з різною її контрольованістю	Частота визначення чутливості лімфоцитів до дексаметазону <i>in vitro</i>				Частота клінічного визначення стероїдної резистентності (<i>in vivo</i>)	
	за інгібіцією проліферації		за індексом індукції/інгібіції дексаметазоном апоптозу			
	n ¹	%	n ¹	%	n ¹	%
<i>Хворі на контрольовану БА (n = 10)</i>						
Лф, резистентні до ДМ	3	30,0	7	70,0	6	60,0
Лф, з помірно зниженою чутливістю до ДМ	7	70,0	–	–		
Лф, з чутливістю до ДМ	–	–	3	30,0	4	40,0
<i>Хворі на неконтрольовану БА (n = 14)</i>						
Лф, резистентні до ДМ	2	14,3	9	64,3	11	78,6
Лф, з помірно зниженою чутливістю до ДМ	12	85,7	–	–		
Лф, з чутливістю до ДМ	–	–	5	35,7	3	21,4
<i>Всього хворих на БА (n = 24)</i>						
Лф, резистентні до ДМ	5	20,8	16	66,7	17	78,6
Лф, з помірно зниженою чутливістю до ДМ	19	79,2	–	–		
Лф, з чутливістю до ДМ	–	–	8	33,3	7	21,4

Примітка 1. n – кількість хворих у групі.

Примітка 2. n¹ – кількість хворих з чутливістю/резистентністю до дексаметазону в групі.

Таким чином запропонований спосіб дозволяє скоротити час проведення дослідження (необхідний для постановки та обліку результатів) з 5–7 діб до 2-х діб та на 64,7 % підвищити точність виявлення *in vitro* резистентності до стероїдів у хворих на бронхіальну астму шляхом визначення індексу інгібіції дексаметазоном активаційного апоптозу лімфоцитів, що, в свою чергу, дозволяє покращити прогноз та своєчасно провести корекцію лікування даної категорії пацієнтів.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Diagnosis and Management of Difficult-to-treat and Severe Asthma in adolescent and adult patients. GINA. 2019. 38 p. URL : [https:// ginasthma.org/gina-ebooks](https://ginasthma.org/gina-ebooks). ;
2. Неконтролируемая бронхиальная астма : что за этим скрывается? / Ю. Г. Белоцерковская и др. // Клиническая медицина. 2018. № 6. С.485–490. ;
3. Бойко Д. М. Медична реабілітація пацієнта з неконтрольованою бронхіальною астмою : 10 років спостереження / Д. М. Бойко // Астма та алергія. 2019. № 1. С. 58–62
4. Asthma control and disease burden in patients with asthma and allergic comorbidities / L. K. Lee et al. // Journal of Asthma. 2018. Vol. 55, № 2. P. 208–219.).
5. Diagnosis and Management of Difficult-to-treat and Severe Asthma in adolescent and adult patients. GINA. 2019. 38 p. URL : [https:// ginasthma.org/gina-ebooks](https://ginasthma.org/gina-ebooks).).
6. Методика определения глюкокортикоидрезистентной фракции лимфоцитов в периферической крови и лимфоидных органах / В. И. Пыцкий и др. // Пат. физиология и эксперим. терапия. 1986. № 5. С. 82.
7. Унифицированные иммунологические методы обследования больных на стационарном и амбулаторном этапах лечения : метод. рекомендации / КНИИФП. Киев, 1988. 18 с.
8. Обследование больных бронхиальной астмой для диагностики стероидной резистентности с учетом клинико-иммунологических и генетических особенностей с целью оптимизации эффективности лечения : метод. рекомендации / Н. И. Ильина и др., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии». Москва, 2017. 22 с.
9. Выявление антиген-специфических гормонорезистентных лимфоцитов крови для прогнозирования эффективности глюкокортикоидной терапии бронхиальной астмы / А. А. Калашникова и др. // Мед. иммунология. 2011. Т. 13, № 2–3. С. 157–166.
10. Вплив дексаметазону на проліферативну активність лімфоцитів периферійної крові у хворих на бронхіальну астму з різним перебігом хвороби / І. Ф. Ільїнська та ін. Режим доступу : <http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2018/ilyinskaya2018.pdf>
11. Cain D. W., Cidlowski J. A. Immune regulation by glucocorticoids // Nature Reviews Immunology. 2017. Vol. 17. P. 233–247.
12. Ільїнська І. Ф. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді (аналітичний огляд) // Лаб. діагностика. 2002. № 3. С. 66–72.

13. Induction of activation driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells / S. Wesselborg , O. Janssen, D. Kabelitz // J. Immunol. 1993. Vol. 150. P. 4338–4345.
14. Апоптоз, роль в патологии и значимость его оценки при клинико-иммунологическом обследовании больных / А. А. Ярилин и др. // Мед. иммунология. 2000. Т. 2, № 1. С. 7–16.).
15. Количественная оценка апоптоза лимфоцитов человека в норме и при патологии / Н. А. Щигленко и др. // J. Immunorehabilitation. 1998. № 8. P. 8.
16. Механизмы дексаметазон-индуцированного апоптоза лимфоцитов при atopической бронхиальной астме / С. В. Бойчук, И. Г. Мустафин, Р. С. Фассахов // Пульмонология. 2003. № 2. С. 10–16..
17. Методы обнаружения и количественной оценки апоптоза (обзор литературы) / А. В. Ткач, Л. А. Иванова, Ю. В. Стеценко // Медицина труда и промышленная экология. 2008. № 12. С. 28–35.
18. Войткова В. В. Изучение апоптоза методом проточной цитофлуориметрии // Вестник ВСНЦ СО РАМН. 2010. Т. 76, № 6. С. 220–225.
19. Detection of Phosphatidylserine Externalization During Apoptosis / S. Kasibhatla et al. // Cold Spring Harb Protoc. 2006. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485875>.
20. 7-Aminoactinomycin D – an overview // ScienceDirect Topics. URL : <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/7-aminoactinomycin-d>
21. Біостатистика / за заг. ред. чл.-кор. АМН України, проф. В.Ф. Москаленка. – К. : Книга плюс, 2009. – С. 41–44.

References

1. [Diagnosis and Management of Difficult-to-treat and Severe Asthma in adolescent and adult patients](https://ginasthma.org/gina-ebooks). GINA. 2019. 38 p. URL : [https:// ginasthma.org/gina-ebooks.](https://ginasthma.org/gina-ebooks) ;
2. Неконтролируемая бронхиальная астма : что за этим скрывается? / Y. H. Belotserkovskaya i dr. // Klynycheskaya medycyna. 2018. № 6. S.485–490.
3. Boyko D. M. Medychna rehabilitatsiya patsiyenta z nekontroliovanoyu bronkhialnoyu astmoyu : 10 rokov sposterezhennya / D. M. Boyko // Astma ta alerhiya. 2019. № 1. S. 58–62
4. Asthma control and disease burden in patients with asthma and allergic comorbidities / L. K. Lee et al. // Journal of Asthma. 2018. Vol. 55, № 2. P. 208–219.).
5. Diagnosis and Management of Difficult-to-treat and Severe Asthma in adolescent and adult patients. GINA. 2019. 38 p. URL : [https:// ginasthma.org/gina-ebooks.](https://ginasthma.org/gina-ebooks)).
6. Metodika opredeleniya glyukokortikoidrezistentnoy fraktsii limfotsitov v perifericheskoy krovi i limfoidnykh organakh / V. I. Pytskiy i dr. // Pat. fiziologiya i eksperim. terapiya. 1986. № 5. S. 82.
7. Unifitsirovannyye immunologicheskiye metody obsledovaniya bol'nykh na statsionarnom i ambulatornom etapakh lecheniya : metod. rekomendatsii / KNIIFP. Kiev, 1988. 18 s.
8. Obsledovaniye bolnykh bronkhialnoy astmoy dlya diagnostiki steroidnoy rezistentnosti s uchetom kliniko-immunologicheskikh i geneticheskikh osobennostey s tselyu optimizatsii effektivnosti lecheniya : metod. rekomendatsii / N. I. Iliina i dr., Federalnoye gosudarstvennoye byudzhethnoye uchrezhdeniye «Gosudarstvennyy nauchnyy tsentr «Institut immunologii». Moskva, 2017. 22 s.
9. Vyyavleniye antigen-spetsificheskikh gormonorezistentnykh limfotsitov krovi dlya prognozirovaniya effektivnosti glyukokortikoidnoy terapii bronkhial'noy astmy / A. A. Kalashnikova i dr. // Med. immunologiya. 2011. T. 13, № 2–3. S. 157–166.
10. Vplyv deksametazonu na proliferatyvnu aktyvnist limfotsytiv peryferiynoyi krovi u khvorykh na bronkhial'nu astmu z riznym perebihom khvoroby / I. F. Iliyinska ta in. Rezhym dostupu : <http://www.ifp.kiev.ua/ftp1/original/2018/ilyinskaya2018.pdf>
11. Cain D. W., Cidlowski J. A. Immune regulation by glucocorticoids // Nature Reviews Immunology. 2017. Vol. 17. P. 233–247.
12. Iliyinska I. F. Apoptoz, apotsytoz ta yikh rol v imunnyy vidpovidi (analychnyy ohlyad) // Lab. diahnozyka. 2002. № 3. S. 66–72.

13. Induction of activation driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells / S. Wesselborg, O. Janssen, D. Kabelitz // *J. Immunol.* 1993. Vol. 150. P. 4338–4345.
14. Apoptoz, rol v patologii i znachimost yego otsenki pri kliniko-immunologicheskom obsledovanii bolnykh / A. A. Yarilin i dr. // *Med. immunologiya.* 2000. T. 2, № 1. S. 7–16).
15. Kolichestvennaya otsenka apoptoza limfotsitov cheloveka v norme i pri patologii / N. A. Shchiglenko i dr. // *J. Immunorehabilitation.* 1998. № 8. R. 8.
16. Mekhanizmy deksametazon-indutsirovannogo apoptoza limfotsitov pri atopicheskoy bronkhialnoy astme / S. V. Boychuk, I. G. Mustafin, R. S. Fassakhov // *Pul'monologiya.* 2003. № 2. S. 10–16.
17. Metody obnaruzheniya i kolichestvennoy otsenki apoptoza (obzor literatury) / A. V. Tkach, L. A. Ivanova, Y. V. Stetsenko // *Medicsina truda i promyshlennaya ekologiya.* 2008. № 12. S. 28–35.
18. Voytkova V. V. Izucheniye apoptoza metodom protochnoy tsitofluorimetrii // *Vestnik VSNTS SO RAMN.* 2010. T. 76, № 6. S. 220–225.
19. Detection of Phosphatidylserine Externalization During Apoptosis / S. Kasibhatla et al. // *Cold Spring Harb Protoc.* 2006. URL : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485875>.
20. 7-Aminoactinomycin D – an overview // *ScienceDirect Topics.* URL : <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/7-aminoactinomycin-d>
21. Biostatystyka / za zah. red. chl.-kor. NAMN Ukrayiny, prof. V. F. Moskalenka. – K. : Knyha plyus, 2009. – S. 41–44.

РЕЗЮМЕ

Нарушение индукции дексаметазоном активационного апоптоза лимфоцитов у больных бронхиальной астмой и его значение в прогнозировании ее неконтролируемого течения

И. Ф. Ильинская, Ю. И. Фещенко, Л. М. Курик, Ю. А. Матвиенко, Л. В. Арефьева
ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии им. Ф. Г. Яновского
Национальной академии медицинских наук Украины», г. Киев, Украина.

Проведено сравнение двух способов выявления *in vitro* резистентности к глюкокортикостероидам у больных бронхиальной астмой, которое позволяет осуществить прогноз ее неконтролируемого течения. Первый широко распространенный способ заключается в определении резистентности лимфоцитов к стероидам по ослаблению ингибиции дексаметазоном пролиферации лимфоцитов (Лф) в реакции их балластной трансформации (РБТЛ). Второй, предложенный авторами, заключается в определении отсутствия индукции (ингибиции) дексаметазоном активационного апоптоза Лф.

Клинические признаки стероидной резистентности были установлены у 78,6 % больных БА. Резистентность Лф к дексаметазону по ослаблению ингибиции пролиферации лимфоцитов была обнаружена у 20,8 % этих больных (чувствительность теста составила всего 29,4%), а по ингибиции дексаметазоном активационного апоптоза этих клеток – у 66,7 % пациентов (чувствительность теста составила 94,1 %).

Предложенный способ позволяет сократить время проведения исследования (необходимый для постановки и учета результатов) с 5-7 суток до 2-х суток и на 64,7 % повысить точность обнаружения *in vitro* резистентности к глюкокортикостероидам у больных бронхиальной астмой. Это в свою очередь позволяет заранее спрогнозировать недостаточную эффективность применения этих препаратов у данной категории пациентов, избежать их необоснованного назначения, своевременно провести коррекцию терапии и предупредить потерю контроля над бронхиальной астмой.

Ключевые слова: бронхиальная астма, прогнозирование неконтролируемого течения, резистентность к глюкокортикостероидам, пролиферация лимфоцитов, апоптоз лимфоцитов

SUMMARY

Impaired induction by dexamethasone of activation lymphocytes apoptosis in patients with bronchial asthma and its significance in predicting its uncontrolled course

I. F. Illyinskaya, Y. I. Feshchenko, L. M. Kuryk Y. A. Matvienko, L. V. Arefyeva

SO «National Institute Phthysiology and pulmonology named after F. G. Yanovsky NAMS of Ukraine»Yanovsky NAMS of Ukraine", Kiev, Ukraine

The comparison of two methods of in vitro detection of glucocorticosteroid resistance in patients with bronchial asthma, which makes it possible to predict its uncontrolled course, was carried out. The first widespread method is to determine the steroids resistance of lymphocytes by weakening the inhibition by dexamethasone of lymphocytes (Lf) proliferation in the reaction of their blast transformation (RBTL). The second, proposed by the authors, is to determine the absence of induction (inhibition) by dexamethasone of activated apoptosis of Lf.

Clinical signs of steroid resistance were found in 78.6 % of BA patients. Lymphocyte resistance to dexamethasone by weakening the inhibition of these cells proliferation was found in 20.8% of these patients (the test sensitivity was only 29.4%), and by dexamethasone inhibition of activated Lf apoptosis was detected in 66.7% of patients (the test sensitivity was 94,1%).

The proposed method allows to reduce the time of the examination (which is necessary for setting and recording the results) from 5-7 days to 2 days and to increase by 64.7% the accuracy of in vitro detection of steroid resistance in patients with bronchial asthma. This, in turn, makes it possible to predict in advance the insufficient effectiveness of these drugs usage in this category of patients, to avoid their unreasonable prescription, in a timely manner to correct therapy and to prevent the loss of bronchial asthma control.

Key words: bronchial asthma, uncontrolled course prognosis, glucocorticosteroid resistance, lymphocyte proliferation, lymphocyte apoptosis