

LUCRĂRI ORIGINALE

Inflamația neutrofilică ca indicator al severității astmului

Adriana Grigoraș¹, Constantin-Cristian Grigoraș², Traian Mihăescu³,
Alina Floarea-Strat⁴, Corina Andriescu⁴, Coriolan Cotuțiu¹

Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

¹ Disciplina de Histologie

³ Disciplina de Pneumologie

² Ambulatoriul de Specialitate, Spitalul Clinic de Pneumologie, Iași

⁴ Laboratorul de Anatomie Patologică, Spitalul Clinic de Boli Infecțioase, Iași

REZUMAT

Scopul acestui studiu a fost de a analiza gradul inflamației neutrofilice la nivelul mucoasei bronșice la pacienții diagnosticați cu astm bronșic.

Material și metodă: Au fost examinați un număr de 21 pacienți cu astm de diferite grade de severitate (conform GINA). Fragmentele de mucoasă bronșică au fost obținute prin fibrobronhoscopie și au fost prelucrate pentru examinarea morfologică în vederea imunomarcării cu anticorpi anti-elastază.

Rezultate: A fost găsit un număr semnificativ mai mare de neutrofile la examinarea microscopică la pacienții cu astm sever față de pacienții cu forme ușoare de astm sau față de martor ($r=0,79$, $p<0,01$).

Concluzii: Rezultatele acestui studiu sugerează că neutrofilele pot fi considerate un marker specific pacienților cu astm bronșic sever.

Cuvinte cheie: astm bronșic, inflamație, neutrofile.

ABSTRACT

Neutrophilic inflammation – indicative of asthma severity

Our main aim in this study was to investigate the number of neutrophils at the bronchial mucosae level in patients diagnosed with bronchial asthma.

Material and methods: We examined a number of 21 patients with different level of severity of asthma (according to GINA). Fragments of bronchial mucosae were obtained through fiberbronchoscopy, prepared for histological examination for performing the immune staining with anti-elastase antibodies.

Results: We found significantly higher number of neutrophils at microscopic examination in the patients with severe asthma than in healthy subjects or mild asthma subjects ($r=0.79$, $p<0.01$).

Conclusion: The results of this study suggest that neutrophils can be considered a specific lesion in patients with severe bronchial asthma.

Key words: bronchial asthma, inflammation, neutrophils.

Introducere

Astmul bronșic este o boală inflamatorie cronică care se caracterizează din punct de vedere microscopic prin prezența de leziuni localizate la nivelul epiteliului bronșic (precum hiperplazia celulelor caliciforme), îngroșarea membranei bazale și, nu în ultimul rând, de leziuni la nivelul laminei proprii^{1,2}. Dintre acestea din urmă, prezența în cantitate variabilă a unui infiltrat inflamator polimorf la nivelul mucoasei bronșice este poate cea mai constantă modificare, aceasta fiind notată indiferent de severitatea bolii^{2,3}. Dacă eozinofilelor și limfocitelor T4, ca și celele principale de la nivelul infiltratului

inflamator, li s-a acordat constant o atenție deosebită, ele constituind obiectul de studiu a numeroaselor cercetări în problematica astmului bronșic, în ultimul timp de un interes crescut se bucură neutrofilele, atât prin prisma cuantificării prezenței acestora, cât și prin elucidarea aspectelor prin care acestea contribuie la desfășurarea mecanismelor fiziopatologice din boala astmatică^{4,5}.

Obiectivul principal este acela de a aprecia semicantitativ numărul de neutrofile la nivelul infiltratului inflamator din lamina propria prin examen imunohistochimic la pacienții cu astm bronșic în stadii diferite de severitate.

Material și metodă

A fost examinat un lot format din 21 de pacienți cu astm bronșic ce au fost dispensarizați prin Ambulatoriul Spitalului Clinic de Pneumologie Iași în perioada ianuarie 2007 – august 2008. La includerea în studiu s-a păstrat clasificarea bolnavilor conform ghidului GINA 2002 (astm intermitent, ușor persistent, moderat persistent și sever persistent), fiind echivalentă treptelor de tratament actuale pentru menținerea controlului bolii⁶. Toți pacienții se aflau sub tratament corticosteroid inhalator cu/fără alte medicații, în doze corespunzătoare treptei de tratament.

Criteriile de includere în lotul examinat au fost următoarele:

- pacienți nefumători;
- diagnosticarea pacientului cu astm bronșic anterior efectuării fibrobronhoscopiei (prin anamneză, obstrucție bronșică cu reversibilitate semnificativă la bronhodilatatoare inhalatorii);
- pacienți care să nu prezinte o altă patologie pulmonară asociată;
- chestionar de control al astmului bronșic ACT \geq 20;
- capacitatea pacientului de a efectua corect o spirometrie, care să îndeplinească criteriile de acceptabilitate și de reproductibilitate;
- acceptul bolnavului de a efectua un examen fibrobronhoscopic cu biopsie bronșică.

Criteriile de excludere au fost următoarele:

- lipsa acceptului pacientului de a realiza un examen fibrobronhoscopic;
- contraindicațiile relative de efectuare a fibrobronhoscopiei (vârsta de peste 75 ani, diateze hemoragice, insuficiență hepatică sau renală avansată, VEMS < 25% din prezis sau sub 1 l/sec, bolnavi în stadii terminale, infarct miocardic recent sau tulburări de ritm grave).

Pacienții au fost supuși inițial unui examen clinic, ulterior fiind efectuate examenul radiologic pulmonar, testele de explorare funcțională pulmonară (spirometria) pentru evaluarea statusului funcțional și pentru actualizarea încadrării în treptele de severitate, și completarea de către fiecare pacient a chestionarului privind controlul astmului (ACT – Asthma Control Test).

Recoltarea fragmentelor de mucoasă bronșică pe cale fibrobronhoscopică s-a realizat de la nivelul pintenilor lobare medii sau bronhiei lobare inferioare drepte.

După fixare în formol și includere la parafină a fost realizată colorarea prin metoda uzuală hematoxilină-eozină (H.E.)⁷. Înainte de interpretarea leziunilor s-a apreciat calitatea biopsiilor (pe preparatele colorate cu H.E.), acestea fiind necesar să corespundă unor exigențe care sunt universale folosite în aceste situații, anume:

- calitatea fixării și colorării;
- probele recoltate să aibă o arie conjunctivă subepitelială de minim 3 mm;
- absența pe lame a aspectelor de fărâmițare a structurilor tisulare secundar tehnicii de recoltare;
- absența zonelor de cartilagi hialin, a mucusului sau a hemoragiilor extinse.

Toate aceste aspecte au fost luate în considerare înainte de a eticheta ca „apt examinării anatomopatologice“, pentru toate biopsiile recoltate.

Pentru a se evita o recoltare insuficientă, au fost extrase 5-7 fragmente tisulare de la fiecare pacient astmatic.

Examenul imunohistochimic a fost realizat cu anticorpi anti-elastază neutrofilică (Clone NP52, cod nr. U 7040), prin metoda avidină-biotină-peroxidază⁸. Evidențierea reacției antigen-anticorp s-a efectuat cu ajutorul unui substrat cromogen de tip 3,3'-diaminobenzidină (DAB). Aprecierea rezultatelor s-a făcut atât prin metodă semicantitativă, cât și în raport cu imunomarcajul realizat pe fragmente de mucoasă bronșică normală (2 martori), pentru a se aprecia calitatea reacției. Evaluarea intensității reacțiilor a fost realizată de către 1 examinator, pe câmpuri microscopice la mărirea \times 400, aprecierea rezultatelor realizându-se pe o scală de la 0-3 (0 sau absente – reacție negativă, 1 sau foarte rare – sub 5 celule enolază-pozitive, 2 sau rare între 5-10 celule enolază – pozitive și 3 sau frecvente – peste 10 celule enolază pozitive).

Studiul microscopic a fost făcut cu ajutorul microscopului Eclipse E600 Nikon, iar imaginile cu ajutorul camerei DN100, programul Lucia Net.

Prelucrarea statistică a fost efectuată cu ajutorul programului specializat SPSS, varianta 17.

Pentru testarea gradului de asociere (corelație) s-au utilizat teste specifice de corelație atât pentru variabile cantitative cât și pentru variabile calitative. Din această categorie s-au folosit testele: Pearson, CHI – pătrat (χ^2), Spearman⁹.

Rezultate

În urma evaluării microscopice a calității biopsiilor bronșice recoltate, pentru fiecare pacient inclus în lotul examinat s-a obținut minim un fragment bioptic corespunzător.

Pacienții din lotul studiat, în urma rezultatelor examenului clinic și a efectuării spirometriei, au fost încadrați în următoarele trepte de severitate a bolii conform clasificării GINA: 4 cazuri de astm bronșic intermitent, 6 cazuri de astm bronșic ușor persistent, 8 cazuri de astm bronșic moderat persistent, 3 cazuri de astm bronșic sever persistent.

Datele clinice și parametrii funcționali ai pacienților examinați sunt prezentate în tabelul I.

Examinarea preparatelor microscopice colorate prin metoda uzuală cu H.E. a evidențiat prezența unui infiltrat inflamator, în cantitate variabilă la nivelul mucoasei bronșice și în concordanță cu treapta de severitate (fig. 1, 2). La întreg lotul studiat infiltratul inflamator din lamina propria a fost, din punct de vedere calitativ, unul de tip polimorf (fig. 3). Astfel, la nivelul său s-au remarcat numeroase limfocite, dar și plasmocite, eozinofile și polimorfonucleare neutrofile.

Pentru evaluarea mai exactă a prezenței neutrofilelor în mucoasa bronșică la pacienții cu astm s-a realizat examenul imunohistochimic cu anticorpi anti-elastază neutrofilică. Acesta a relevat următoarele aspecte:

- la martori nu au fost notate celule elastază-pozitive în lamina propria (fig. 4);
- la 50% dintre pacienții cu astm bronșic intermitent s-au observat foarte rare neutrofile, acestea fiind „dispersate“ în cadrul infiltratului inflamator la nivelul mucoasei bronșice și localizate constant imediat sub epiteliul de suprafață (fig. 5);
- numărul celulelor elastază-pozitive a avut o tendință de ușoară creștere la pacienții cu astm bronșic ușor persistent (fig. 6) și moderat persistent, acestea însă fiind cel

Tabelul I.
Caracteristici generale și parametri funcționali ai pacienților incluși în lot

Pacienți cu astm bronșic (n = 21)	Valori medii ±DS / n	min	Mediana	max	p (95%CI)
Vârsta medie (ani)	44,1 ± 16,1	22	42	70	
Raportul bărbați/femei	10/11				
Mediul de proveniență (urban/rural)	17/4				
Durata medie a astmului (ani)	16,7 ± 9,8	1.0	20.0	30.0	0.26792
VEMS (L/sec)	3.1±0.8	2.1	3.0	4.5	
VEMS (% din ideal)	79.3%±20.3%	45.0%	79.8%	116.0%	

Notă: Valorile sunt prezentate ca medie ± deviația standard; VEMS = volumul expirator maxim pe secundă;

mai adesea grupate în „mici arii de neutrofile“ în zona superficială a mucoasei bronșice;

- cel mai mare număr de neutrofile în țesutul conjunctiv al mucoasei bronșice a fost remarcat la pacienții cu forme severe de boală. Celulele elastază-pozitive au apărut de

data aceasta evident „concentrate“ în mici grupuri celulare localizate în partea internă a mucoasei (fig. 7). În zona externă a mucoasei bronșice, în compoziția infiltratului inflamator la pacienții evaluați în cadrul lotului nu s-a constatat prezența de neutrofile.

Figura 1.

Inflamație ușoară în lamina propria – astm bronșic ușor persistent, H.E. x 100

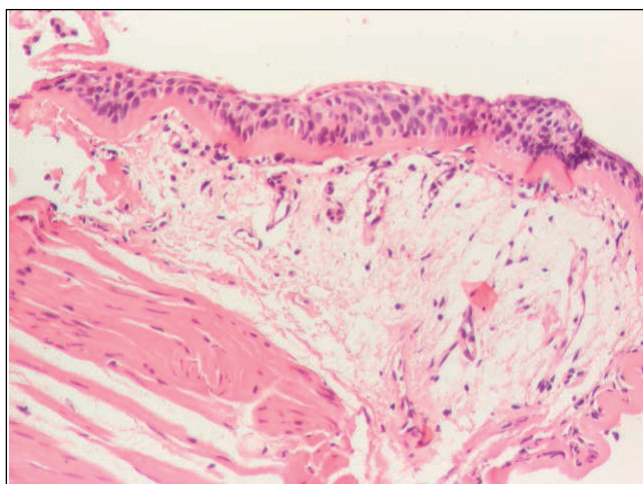


Figura 2.

Inflamație importantă în lamina propria – astm bronșic moderat persistent, H.E. x 100

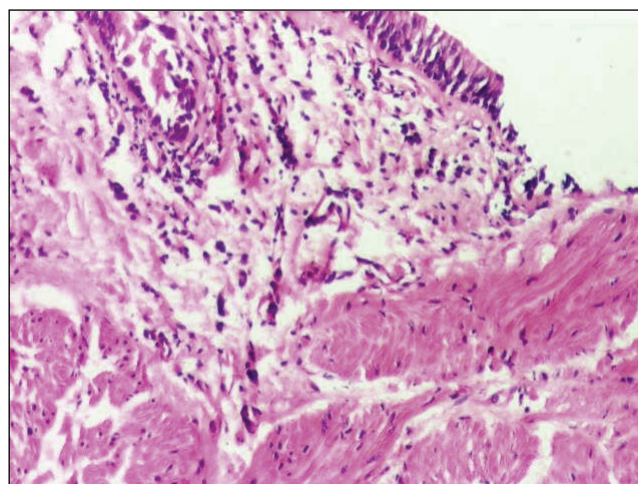


Figura 3.

Infiltrat inflamator polimorf în lamina propria – astm bronșic sever, H.E. x 400

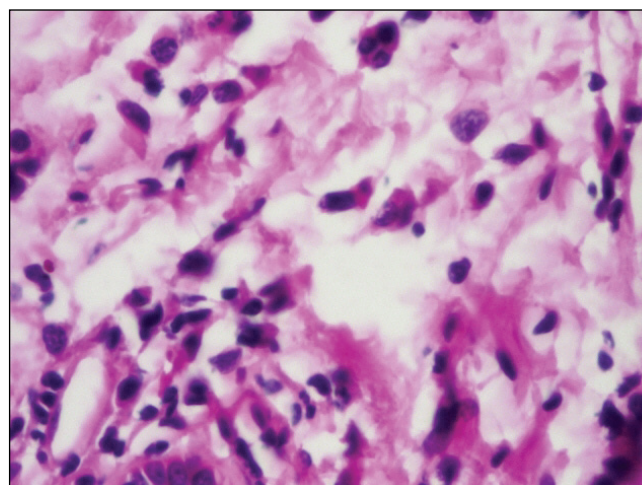


Figura 4.
Reacție negativă – martor, reacție IHC cu
Ac anti-elastază neutrofilică x 100

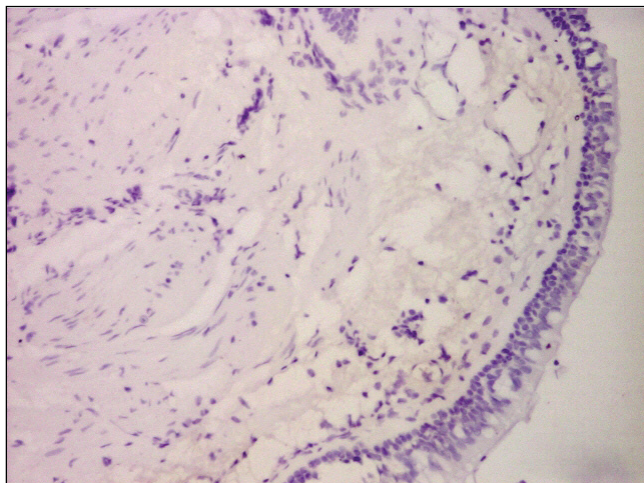


Figura 5.
Foarte rare neutrofile în lamina propria – astm bronșic
intermitent, reacție IHC cu Ac anti-elastază neutrofilică x 200

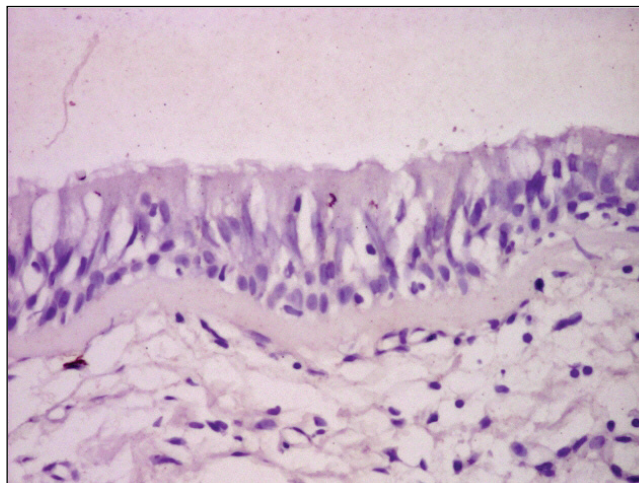


Figura 6.
Rare neutrofile în lamina propria – astm bronșic
ușor persistent, reacție IHC cu Ac
anti-elastază neutrofilică x 200

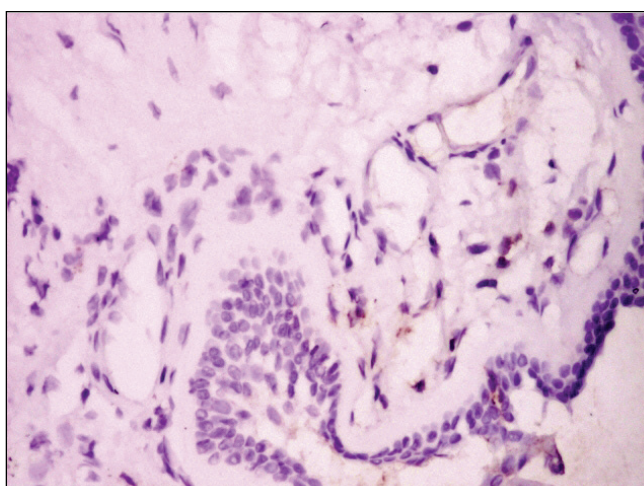
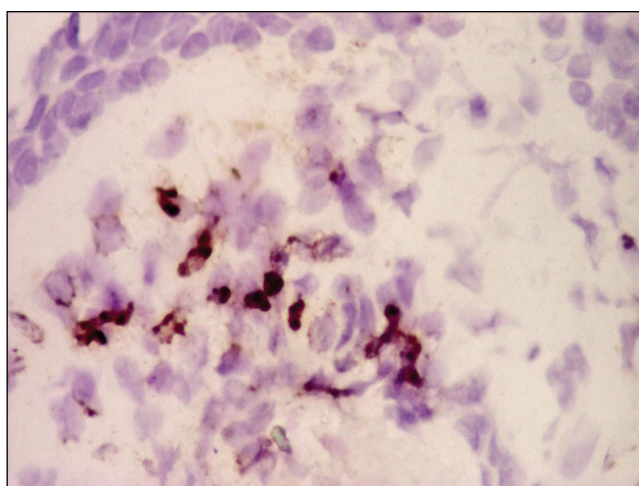


Figura 7.
Grup de neutrofile în lamina propria – astm bronșic
sever persistent, reacție IHC cu Ac
anti-elastază neutrofilică x 400



Distribuția nivelului expresiei elastazei neutrofilice în raport cu severitatea bolii astmatice este prezentată în tabelul II.

Tabel II.
Distribuția cazurilor în funcție de intensitatea inflamației neutrofilice vs. gradul de severitate al astmului bronșic

Intensitatea inflamației neutrofilice	Intermitent	Ușor persistent	Moderat persistent	Sever persistent
Absente	2	1	0	0
Foarte rare (+)	2	3	2	0
Rare (++)	0	2	6	0
Frecvente (+++)	0	0	0	3
Total	4	6	8	3

Analiza statistică realizată a evidențiat o asociere semnificativă ($r=0.79$, $p<0.01$) între inflamația neutrofilică și gradul de severitate al astmului bronșic, un nivel important al inflamației neutrofilice regăsindu-se în cazurile cu astm bronșic sever persistent (tabelul III).

Aceste rezultate sunt susținute atât de prezența unei corelații inverse semnificative între VEMS și nivelul inflamației neutrofilice ($r=-0.81$, $p<0.01$) (tabelul IV), cât și de aspectul dreptei de regresie (figura 8).

Ca urmare, conform rezultatelor se poate afirma faptul că inflamația neutrofilică este un „marker lezional” caracteristic formelor severe de boală.

Discuții

Recunoscut în mod clasic ca și leziune prezentă obligatoriu la pacienții cu astm bronșic, infiltratul inflamator de la nivelul mucoasei bronșice a reprezentat obiectul de studiu a numeroase cercetări. Acestea au vizat stabilirea nivelului său cantitativ în raport cu forma de gravitate a bolii astmatice, a compoziției celulare a acestuia și, mai recent, obiectivarea citokinelor produse de către acestea și rolul lor în lanțul fiziopatologic al bolii¹⁰.

În ciuda tratamentului steroidian aplicat cronic la pacienții cu forme severe persistente de boală, s-a constatat că intensitatea infiltratului inflamator se menține la un nivel important. De dată

Tabel III.

Parametrii estimați în testarea asocierii intensității inflamației neutrofilice vs. gradul de severitate al astmului bronșic

	Chi-pătrat χ^2	df	p 95% interval de încredere
Pearson Chi-pătrat – χ^2	30.72917	df=9	0.00033
M-LChi-square	27.49340	df=9	0.00116
Coefficient de corelație (Spearman Rank R)	0.7981536		0.00001

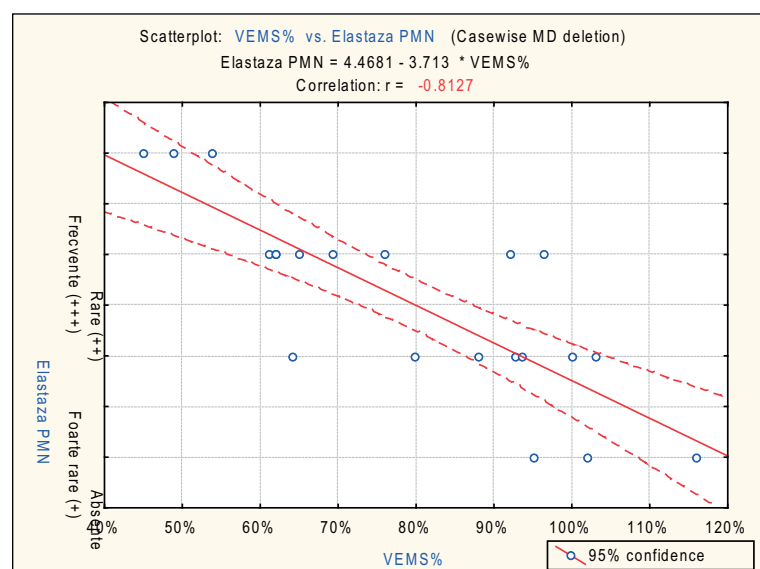
Tabel IV.

Rezultatul testului de corelație a intensității inflamației neutrofilice vs. VEMS

Intensitate inflamației neutrofilice vs. VEMS (%)	r-coeficient de corelație (95% interval de confidență)	P
Testul Spearman Rank R	-0.8127	0.000

Figura 8.

Dreapta de regresie în corelația nivelului intensității inflamației neutrofilice vs. VEMS



mai recentă în atenția cercetătorilor au intrat și neutrofilele din cadrul profilului inflamator de la nivelul mucoasei bronșice, unele studii arătând că neutrofilele sunt prezente în cantități mai mari în căile aeriene ale pacienților cu astm sever decât la pacienții cu astm ușor sau la subiecții de control¹¹.

Eozinofilele, ca și celule asociate bolilor alergice, prezente la nivelul laminei propria, nu explică totalitatea fenomenului inflamator observat în astm. De aceea tot mai mult se crede că neutrofilele din structura infiltratului inflamator bronșic sunt la rândul lor mai întâi concentrate la nivelul corionului și apoi activate la acest nivel. Secundar activării lor se eliberează o serie de mediatori care pot promova și prelungi simptomele caracteristice bolii astmatice. De aceea se sugerează tot mai mult astăzi ideea că neutrofilele joacă un loc central în procesul inflamator de la nivelul peretelui bronșic alături de eozinofile și limfocite^{12,13}. Mai mult, conform rezultatelor prezentate de către Shaw DE și colab. în urma unui studiu efectuat pe spută indusă la un număr de 1197 de pacienți astmatici, inflamația cu neutrofile joacă un rol important în progresia și persistența obstrucției bronșice¹⁴. Însă, mecanismele de interacțiune dintre eozinofile (celule constant prezente în structura infiltratului inflamator) și neutrofile sunt încă puțin cunoscute¹⁵. Conform rezultatelor unui studiu recent, proteazele neutrofilice determină activarea eozinofilelor, care la rândul lor produc superoxid, citokine proinflamatorii și factori chemotactici pentru neutrofile și de aceea, probabil apare agregarea acestora în mucoasa bronșică la pacienții cu forme severe persistente de astm¹⁶. Din punct de vedere al inflamației eozinofilice, Wenzel și colab pe un lot de 44 pacienți cu astm sever la care au efectuat biopsii endobronșice, au remarcat existența a două subtipuri inflamatorii distincte în funcție de prezența sau absența eozinofilelor, inflamația neutrofilică fiind însemnată și fără diferențe între cele două subtipuri¹⁷.

Acest fenomen de concentrare a neutrofilelor în mucoasa bronșică a fost remarcat și în studiul propriu la pacienții cu forme severe persistente de boală, în urma analizei microscopice a fragmentelor tisulare marcate cu anticorpi anti-elastază. Analiza statistică realizată a evidențiat o asociere semnificativă ($r=0.79$, $p<0.01$, 95%CI) între inflamația neutrofilică și gradul de severitate al astmului bronșic, un nivel important al inflamației neutrofilice regăsindu-se în cazurile cu astm bronșic sever persistent.

Practic, prezența unui număr mai mare de neutrofile în mucoasa bronșică în unele cazuri de astm bronșic sever este elementul ce este astăzi cert stabilit. Acest fapt are loc chiar sub tratament corticosteroidian în doze mari¹⁸. De altfel, Wenzel și colab subliniază persistența inflamației la astmaticii severi în ciuda tratamentului cu doze mari de glucocorticoizi, ca o consecință fie a severității bolii, fie a tratamentului sau fie a unor factori încă nedefiniți¹⁹.

Mai mult, s-a observat *in vitro* faptul că în mod paradoxal corticosteroidii determină creșterea supraviețuirii neutrofilelor prin reducerea apoptozei lor și, ca urmare, corticosteroidii ar putea exacerba activitatea neutrofilelor *in vivo*²⁰. Corticosteroidii și citokinele ar putea suprima apoptoza neutrofilelor prin reglarea sintezei de leucotriene B4 endogenă. Astfel, blocarea specifică a sintezei sau a receptorilor pentru leucotriena B4 ar determina inducerea apoptozei neutrofilelor¹⁸.

Concluzii

Deși clasică, infiltrarea mucoasei bronșice cu o gamă variată de celule rămâne în actualitate, mai ales prin prisma studiului interacțiunilor intercelulare și, mai nou, prin studiul apoptozei acestora și, nu în ultimul rând, prin stabilirea efectelor diferitelor medicamente folosite în schemele terapeutice. Prezența neutrofilelor în număr mare la nivelul infiltratului inflamator bronșic reprezintă un marker de severitate a bolii astmatice.

Bibliografie

1. Simon J. *General Pathology (Paperback)*. BiblioBazaar, LLC, Charleston, USA, 2008.
2. Kumar V, Abbas K, Fausta N. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th Edition, Elsevier Saunders, 2005.
3. Majno G, Joris I. *Cells, Tissues and Disease: Principles of General Pathology (Hardcover)*, 2nd Edition, Oxford University Press, 2004.
4. Bousquet J, Chané P, Campbell AM, Lacoste JY, Poston R, Enander I, Godard P, Michel FB. Inflammatory processes in asthma. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991; 94:227-232.
5. Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007; 67:676-680.
6. Global strategy for asthma management and prevention (GINA). National Institute of Health. National heart, lung and blood institute, 2002; *GINA, NHLBI/WHO* 2002; 2006.
7. Bancroft J, Stevens A, Turner D. *Theory and practice of histological techniques*. Third edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1990.
8. Ardeleanu C, Comănescu V, Zaharia B. *Imunohistochimie – principii generale și aplicații în diagnosticul histopatologic*. Ed. Sitech, Craiova, 1999.
9. Brian S. Everitt. *Modern Medical Statistics*, Oxford University Press Inc., New York, 2003.
10. Fahy JV, Corry DB, Boushey HA. Airway inflammation and remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2000; 6(1):15-20.
11. Wenzel SE, Fahy JV, Irvin CG, Peters SP, Spector S, Szefer SJ. Proceedings of the ATS Workshop on Refractory Asthma: current understanding, recommendations and unanswered questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:2341-2351.
12. Macdowell AL, Peters SP. Neutrophils in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 7(6):464-8
13. Boyce J, Broide D, Matsumoto K, Bochner B. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2008. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(3):569-74.
14. Shaw D, Berry M, Hargadon B, Mc Kenna S, Shelley MJ, Green RH. Association between neutrophilic airway inflammation and airflow limitation in adults with asthma. *Chest* 2007; 132(6):1871-5.
15. Wenzel SE. Eosinophils in asthma-closing the loop or opening the door? *N Engl J Med* 2009; 360(10):1026-8.
16. Hiraguchi Y, Nagao M, Hosoki K, Tokuda R, Fujisawa T. Neutrophil Proteases Activate Eosinophil Function *in vitro*. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 146(1):16-21.
17. Wenzel SE, Schwartz LB, Langmack EL, Halliday JL, Trudeau JB, Gibbs RL, Chu HW. Evidence that severe asthma can be divided pathologically into two inflammatory subtypes with distinct physiologic and clinical characteristics. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1001-1008.
18. Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy* 2000; 30(1):22-7
19. Wenzel SE, Szefer SJ, Leung DYM, Sloan SI, Rex MD, Martin RJ. Bronchoscopic evaluation of severe asthma: persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:737-743.
20. Cox G. Glucocorticoid treatment inhibits apoptosis in human neutrophils: separation of survival and activation outcomes. *J Immunol* 1995; 154: 4719-4725.