

УДК 616.248-053.2-02-097

DOI 10.20538/1682-0363-2017-2-170-179

Для цитирования: Просекова Е.В., Ситдикова Т.С., Долгополов М.С., Турянская А.И., Сабыныч В.А., Забелина Н.Р. Иммунонные механизмы реализации вирус-индуцированного и аллерген-индуцированного фенотипов бронхиальной астмы у детей. *Бюллетень сибирской медицины*. 2017; 16 (2): 170–179

Иммунные механизмы реализации вирус-индуцированного и аллерген-индуцированного фенотипов бронхиальной астмы у детей

Просекова Е.В.¹, Ситдикова Т.С.², Долгополов М.С.¹,
Турянская А.И.¹, Сабыныч В.А.¹, Забелина Н.Р.¹

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (ТГМУ)
Россия, 690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

² Владивостокский клинико-диагностический центр
Россия, 690001, г. Владивосток, ул. Спортивная, 10

РЕЗЮМЕ

Цель исследования – анализ иммунных механизмов реализации вирус-индуцированного и аллерген-индуцированного фенотипов бронхиальной астмы у детей.

Материал и методы. Проведен комплексный анализ показателей врожденного и адаптивного иммунитета у 98 детей с бронхиальной астмой (БА) в возрасте 3–11 лет в группах с вирус-индуцированным ($n = 49$) и аллерген-индуцированным ($n = 49$) фенотипами. Верификация фенотипов БА проводилась в соответствии с международным согласительным документом PRACTALL (2008). Критерии исключения из исследования: тяжелое течение БА и иммунокорректирующая терапия в предшествующие 6 мес. Оценку клеток проводили на проточном цитофлуориметре COULTER EPICS XL (Beckman Coulter Inc., США) Иммуноферментным методом определяли уровни цитокинов (реактивы R & D Diagnostics Inc., США) и IgE (реактивы «Компании Алкор Био», г. Санкт-Петербург). Для исследования продукции цитокинов использовали реактивы фирмы «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). При статистической обработке результатов использовали программу Statistica 10; исследование связей проводили с помощью метода ранговой корреляции Спирмена; уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты. При БА у детей выявлено усиление экспрессии маркера активации Т-лимфоцитов HLA-DR⁺ ($p < 0,05$) при снижении CD3⁺CD95⁺ ($p < 0,01$), высокий уровень сывороточного IgE ($p < 0,01$), обратная зависимость сывороточного содержания ИФН γ и IgE ($r = -0,16$), ИФН γ и ИЛ-13 ($r = -0,25$), прямая зависимость ИЛ-17А и IgE ($r = 0,48$), IgE и ИЛ-13 ($r = 0,56$). При аллерген-индуцированном фенотипе БА отмечены: низкая экспрессия на клетках Т-лимфоцитов CD95⁺, превалирование цитокинов Th-2 профиля, высокий митоген-индуцированный синтез ИЛ-4 и низкая индукционная выработка ИФН γ . При вирус-индуцированном фенотипе БА количество цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров, экспрессия активационных маркеров и CD95⁺ на Т-лимфоцитах, митоген индуцированный синтез клетками ИФН γ ниже показателей здоровых детей (при $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,04$; $p < 0,01$ соответственно). В данной группе выше, чем у детей с аллерген-индуцированным фенотипом, содержание лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, абсолютное число Т-лимфоцитов, Т-хелперов, В-лимфоцитов ($p < 0,001$) и сочетанный Th-2-Th-17-цитокиновый профиль сыворотки крови.

Заключение. При вирус-индуцированном фенотипе БА у детей выявлены иммуноопосредованные факторы, предрасполагающие к персистенции вирусных инфекций и инициации сенсibilизации

✉ Просекова Елена Викторовна, e-mail: pros.ev@mail.ru.

с развитием эозинофильного воспаления: нарушения клеточной цитотоксичности, преобладание цитокинов профилей Th2 и Th17, угнетение индуцированной выработки клетками крови ИФН γ . У детей с реализацией аллерген-индуцированного фенотипа БА изменения в системе адаптивного реагирования характеризуются усилением пролиферации, угнетением процессов негативной регуляции, активацией синтеза цитокинов Th2-профиля, усилением синтеза IgE.

Ключевые слова: иммунные механизмы, вирус-индуцированный, аллерген-индуцированный фенотипы, бронхиальная астма, дети.

ВВЕДЕНИЕ

Широкая распространенность у детей, хронический характер воспаления при патофизиологической и клинической гетерогенности определяют актуальность изучения биологических маркеров фенотипов бронхиальной астмы (БА) для подбора патогенетически обоснованной базисной терапии [1–5]. Клинические фенотипы бронхиальной астмы разделяются на подгруппы в зависимости от преобладающего направления иммунного ответа. Биомаркерами эндотипов бронхиальной астмы являются цитокины, регулирующие иммунный ответ по профилю Т-лимфоцитов хелперов (Th-1, Th-2, Th-17) [5–8]. В спектре характеристик воспаления, определяющих фенотип заболевания, учитывается активность цитокинов и функциональные изменения интерферон-продуцирующих клеток, влияющих на эффективность противовоспалительной терапии различных фенотипов БА у детей. Иммунная реакция организма на антигены инфекционной и неинфекционной природы определяется процессами пролиферации, дифференцировки и программированной гибели лимфоцитов. Эффекторное свойства иммунокомпетентные клетки реализуют через синтез различных цитокинов [9–12].

Цель исследования – анализ иммунных механизмов реализации вирус-индуцированного и аллерген-индуцированного фенотипов бронхиальной астмы у детей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 98 детей (в возрасте 3–11 лет) с верифицированным диагнозом вирус-индуцированного ($n = 49$) и аллерген-индуцированного ($n = 49$) фенотипов бронхиальной астмы с легким (10,22%) и средней степени тяжести (89,78%) клиническим течением болезни в межприступный период, прошедшие обследование, находящиеся на диспансерном наблюдении в городском аллерго-респираторном центре и 30 здоровых сверстников, наблюдавшихся в центре здоровья Владивостокского клинко-диагностического центра. Верификация фенотипов

БА проводилась в соответствии с рекомендациями международного согласительного документа PRACTALL (2008) European Academy of Allergy and Clinical Immunology and the American Academy of Allergy по результатам наследственного анамнеза, анамнеза заболевания, аллергологического обследования (скарификационные пробы, определение общего и специфического IgE к бытовым, эпидермальным, пыльцевым аллергенам в сыворотке крови), цитологического исследования мокроты и назального секрета и ПЦР-анализа выявления РНК и ДНК вирусов в соскобе со слизистой зева (респираторно-синцитиального, парагриппа, аденовируса, риновируса, ВЭБ, цитомегаловируса). Критериями исключения из исследования являлись тяжелое течение бронхиальной астмы и применение иммунокорректирующих препаратов в предшествующие 6 мес. Клинико-лабораторное обследование осуществляли на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии Тихоокеанского государственного медицинского университета и в иммунологической лаборатории краевого клинического центра по профилактике и борьбе со СПИДом и инфекционными заболеваниями Краевой клинической больницы № 2 (г. Владивосток).

Материалом исследования иммунологических параметров являлась венозная кровь. Анализ лейкоцитов, субпопуляционного состава лимфоцитов, процессов активации клеток периферической крови проводили с помощью многопараметрового проточного цитофлуориметра COULTER EPICS XL (Beckman Coulter Inc., США), станции для подготовки проб Coulter Prep Plus и Coulter TO-prep с подбором панелей моноклональных антител с многоцветной комбинацией флуорохромов. Для иммунофенотипирования использовали флуоресцентные частицы Flow Count. Определяли Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, регуляторный индекс, В-клетки, натуральные киллеры (НК-клетки), цитолитические Т-клетки (НКТ-клетки) и активированные Т- и В-клетки (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD95⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD3⁻CD19⁺, CD3⁻CD16⁺CD56⁺, CD3⁺

CD16⁺ CD56⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺HLA-DR⁺, CD3⁺HLA-DR⁺). Результаты представлены в абсолютных и относительных (%) единицах количества позитивных клеток с учетом данных клинического анализа крови.

Уровни интерлейкинов (ИЛ) 4, 6, 8, 13, 17А и интерферона-гамма (ИФН γ) в сыворотке крови исследовали в сэндвич-варианте твердофазного иммуноферментного анализа реактивами фирмы R & D Diagnostics Inc. (США) согласно прилагаемой инструкции с учетом результатов на иммуноферментном анализаторе и расчетом построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы (в пикограммах в миллилитре, пг/мл). Спонтанную и митоген-индуцированную продукцию ИЛ-4 и ИФН γ клетками цельной крови исследовали с применением набора реагентов «ЦИТОКИН-СТИМУЛ-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Содержание общего и специфического IgE исследовали методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов ООО «Компания Алкор Био» (г. Санкт-Петербург) и выражали в МЕ/мл.

Для статистической обработки цифровых данных использовали методы описательной, параметрической и непараметрической статистики

программы Statistica 10 для вычисления средней арифметической (M), среднего квадратичного отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической (m), доверительного интервала (ДИ 95–99%), коэффициента достоверности показателя (t) и различий (p) с критическим уровнем значимости $p < 0,05$. Для исследования связей проводили корреляционный анализ, рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r). Проверку нормальности распределения значений признака осуществляли с помощью критерия Шапиро – Уилка. Частотное распределение данных в каждой из сравниваемых групп соответствовало закону нормального распределения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

У детей с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми сверстниками выявлены: сопоставимая обеспеченность лейкоцитами и натуральными киллерами, преобладание гранулоцитов, снижение абсолютного числа лимфоцитов и Т-лимфоцитов, усиление экспрессии активационных маркеров, ответственных за инициацию иммунного ответа (CD3⁺CD25⁺) и раннюю активацию процессов пролиферации Т-лимфоцитов, низкое абсолютное число В-лимфоцитов (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Показатели иммунокомпетентных клеток в периферической крови детей с бронхиальной астмой (БА) и здоровых сверстников							
№	Показатель	Ед. измерения	Здоровые дети, $n = 30$		Дети с БА, $n = 98$		t (p)
			$M \pm m$	ДИ	$M \pm m$	ДИ	
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	7,32 ± 0,30	6,82–7,82	7,47 ± 0,31	6,96–7,97	0,35 (>0,05)
2	Лимфоциты	%	44,39 ± 1,74	41,51–47,27	37,10 ± 1,65	34,36–39,83	3,05 (<0,01)
		10 ⁹ /л	3,37 ± 0,18	3,08–3,66	2,78 ± 0,16	2,52–3,06	2,53 (<0,05)
3.	Гранулоциты,	%	46,26 ± 1,16	44,33–48,18	53,34 ± 2,04	51,95–58,73	3,87 ($p < 0,001$)
		10 ⁹ /л	3,48 ± 0,19	3,15–3,81	4,11 ± 0,21	3,74–4,47	2,12 (<0,05)
4.	Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺	%	71,26 ± 1,15	69,34–73,17	71,08 ± 0,84	69,68–72,47	0,13 (>0,05)
		кл/мкл	2356,90 ± 126,95	2146,17–2567,65	1929,64 ± 120,94	1728,87–2130,40	2,44 (<0,05)
5.	Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	39,91 ± 1,37	37,64–42,18	36,05 ± 1,29	33,95–38,15	2,075 (0,05)
		кл/мкл	1335,91 ± 93,51	1180,68–1491,13	969,91 ± 60,66	869,21–1070,61	3,28 (<0,01)
6.	Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	27,22 ± 1,24	25,16–29,27	29,31 ± 1,22	27,28–31,33	1,20 (>0,05)
		кл/мкл	893,73 ± 55,73	801,22–986,23	809,91 ± 70,47	692,94–926,88	0,93 (>0,05)
7.	Т-лимфоциты активированные CD3 ⁺ CD25 ⁺	%	4,38 ± 0,24	4,08–5,21	6,97 ± 0,41	6,28–7,65	3,19 (<0,01)
		кл/мкл	137,45 ± 4,67	131,65–144,79	189,14 ± 16,06	162,48–215,79	3,95 (<0,01)
8.	В-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺	%	16,49 ± 0,91	14,99–17,99	15,30 ± 0,75	14,05–16,55	1,01 (>0,05)
		кл/мкл	548,59 ± 41,31	480,02–617,16	420,36 ± 36,98	358,97–481,75	2,31 (<0,05)
9.	Цитолитические NK-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	%	11,10 ± 1,20	9,09–13,10	11,70 ± 0,96	10,11–13,29	0,39 (>0,05)
		кл/мкл	363,50 ± 42,42	293,09–433,91	310,41 ± 28,24	263,54–357,28	1,04 (>0,05)
10.	Цитолитические NKT-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	%	6,71 ± 0,65	5,63–7,79	6,49 ± 0,64	5,43–7,56	0,23 (>0,05)
		кл/мкл	211,36 ± 18,78	180,19–242,54	180,77 ± 23,02	142,57–218,99	1,03 (>0,05)

При БА у детей определено усиление экспрессии маркера активации Т-лимфоцитов, участвующих в регуляции распознавания и эффекторных этапах иммунного ответа HLA-DR+ ((4,09 ± 0,20)% и (104,14 ± 14,02) кл/мкл против (2,07 ± 0,23)% и (75,70 ± 12,20) кл/мкл в группе здоровых сверстников соответственно при $p < 0,05$), количество CD3+CD95+-лимфоцитов достоверно ниже, чем в группе здоровых сверстников ((2,65 ± 0,35)% против (6,12 ± 0,28)% соответственно $p < 0,01$). У детей с бронхиальной астмой выявлено увеличение содержания сывороточного IgE ((314,80 ± 28,25) МЕ/мл, ДИ (308,62–444,66) МЕ/мл против (53,60 ± 16,17) МЕ/мл, ДИ (26,75–80,46) МЕ/мл в группе здоровых сверстников соответственно при $p < 0,01$).

Исследования цитокинового профиля сыворотки крови у детей с БА выявили: содержание ИФН γ (15,73 ± 1,66) пг/мл в ДИ 12,64–18,77 пг/мл, ИЛ-4 (24,80 ± 1,77) пг/мл в ДИ 23,53–26,08 пг/мл, ИЛ-6 (8,70 ± 1,68) пг/мл в ДИ 7,05–12,76 пг/мл, ИЛ-8 (31,63 ± 2,76) пг/мл в ДИ 27,04–36,01 пг/мл, ИЛ-13 (22,57 ± 0,74) пг/мл в ДИ 21,34–23,80 пг/мл, ИЛ-17А (143,74 ± 9,66) пг/мл в ДИ 112,37–172,43 пг/мл. В группе здоровых сверстников данные показатели составили соответственно: ИФН γ (38,60 ± 3,46) пг/мл в ДИ 29,31–54,35 пг/мл; ИЛ-4 (2,55 ± 0,8) пг/мл в ДИ 1,99–3,25 пг/мл; ИЛ-6 (3,70 ± 0,80) пг/мл в ДИ 1,85–4,95 пг/мл; ИЛ-8 (10,92 ± 1,00) пг/мл в ДИ 9,26–12,58 пг/мл; ИЛ-13 (8,01 ± 1,6) пг/мл в ДИ 6,58–13,16 пг/мл; ИЛ-17А (48,40 ± 4,65) пг/мл в ДИ 40,67–56,13 пг/мл при

$p < 0,01$. Проведенные исследования при БА у детей в сыворотке крови выявили слабую обратную корреляционную зависимость содержания ИФН γ и IgE ($r = -0,16$), прямую средней силы корреляционную зависимость уровня ИЛ-17А и общего IgE ($r = 0,48$), прямую корреляционную зависимость содержания IgE и ИЛ-13 ($r = 0,56$) и обратную зависимость концентрации ИФН γ и ИЛ-13 ($r = -0,25$).

Определение функциональной активности ИФН γ и ИЛ-4 продуцирующих клеток зафиксировало средние показатели их спонтанной продукции клетками крови у детей с БА на уровне (8,97 ± 0,78) пг/мл и (4,72 ± 0,35) пг/мл, здоровых сверстников (11,70 ± 0,88) пг/мл и (1,72 ± 0,07) пг/мл соответственно при $p < 0,001$. Среди здоровых детей у 29 из 30 отмечались адекватный ответ на митоген, увеличение продукции и индукция секреции ИФН γ (ДИ 18,21–35,47 пг/мл) и у 21 ребенка из 98 с БА (ДИ 7,42–10,44 пг/мл). Увеличение продукции и индукция секреции ИЛ-4 на митоген наблюдались у 10 здоровых детей (ДИ 6,31–9,15 пг/мл) и 95 детей с БА (ДИ 16,92–19,71 пг/мл).

Результаты исследования механизмов врожденного и адаптивного иммунного ответа у детей с вирус-индуцированным и аллерген-индуцированным фенотипами бронхиальной астмы выявили вариативность функциональных и количественных характеристик иммунокомпетентных клеток (табл. 2) и цитокинового профиля у детей с различными фенотипами болезни.

Таблица 2

Показатели иммунокомпетентных клеток в периферической крови детей с вирус-индуцированным и аллерген-индуцированным фенотипами бронхиальной астмы							
№	Показатель	Ед. измерения	Дети с вирус-индуцированной БА (n = 49)		Дети с аллерген-индуцированной БА (n = 49)		t (p)
			M ± m	ДИ	M ± m	ДИ	
1.	Лейкоциты	10 ⁹ /л	10,73 ± 0,59	9,70–11,76	7,39 ± 0,13	6,89–7,90	4,74 (<0,001)
2.	Лимфоциты	%	37,21 ± 1,65	34,47–39,94	40,38 ± 1,90	37,23–43,54	1,26 (>0,05)
		10 ⁹ /л	3,74 ± 0,18	3,43–4,06	2,70 ± 0,19	2,48–3,01	3,95 (<0,001)
3.	Гранулоциты	%	57,84 ± 1,78	54,88–60,79	54,98 ± 1,94	50,76–58,20	1,01 (>0,05)
		10 ⁹ /л	5,23 ± 0,50	4,39–6,07	4,08 ± 0,26	3,59–4,38	2,04 (<0,05)
4.	Т-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁻	%	72,31 ± 1,07	70,53–74,08	71,03 ± 0,90	69,53–72,94	0,91 (>0,05)
		кл/мкл	2596,75 ± 128,07	2384,15–2809,35	1902,83 ± 112,39	1716,26–2089,41	4,072 (<0,001)
5.	Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	44,01 ± 1,08	42,22–45,80	35,47 ± 1,23	33,44–37,50	5,22 (<0,001)
		кл/мкл	1425,83 ± 94,28	1269,33–1582,34	953,42 ± 58,12	856,92–1049,91	4,26 (<0,001)
6.	Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	25,35 ± 0,94	23,78–26,91	28,39 ± 1,09	26,58–30,28	2,11 (<0,05)
		кл/мкл	727,17 ± 64,15	620,67–833,66	799,42 ± 65,03	691,47–907,36	0,79 (>0,05)
7.	Т-лимфоциты активированные CD3 ⁺ CD25 ⁺	%	6,13 ± 0,29	5,64–6,61	6,97 ± 0,41	6,28–7,65	1,66 (>0,05)
		кл/мкл	204,00 ± 14,67	179,65–228,35	189,14 ± 16,06	162,48–215,79	0,68 (>0,05)
8.	В-лимфоциты CD3 ⁺ CD19 ⁺	%	17,53 ± 0,75	16,29–18,78	15,23 ± 0,69	14,05–16,41	2,23 (<0,05)
		кл/мкл	616,92 ± 41,04	548,78–685,05	412,92 ± 34,35	355,89–469,93	3,81 (<0,001)

О к о н ч а н и е т а б л . 2

№	Показатель	Ед. изме- рения	Дети с вирус-индуцированной БА (n = 49)		Дети с аллерген-индуцированной БА (n = 49)		t (p)
			M ± m	ДИ	M ± m	ДИ	
9.	Цитолитические NK-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	%	8,27 ± 0,35	7,69–8,85	12,93 ± 0,92	10,39–13,47	3,70 (<0,001)
		кл/мкл	261,70 ± 10,90	243,58–279,84	327,04 ± 12,87	274,43–365,60	2,37 (<0,05)
10.	Цитолитические NKT-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	%	4,61 ± 0,23	4,13–5,09	6,37 ± 0,60	5,37–7,36	2,62 (<0,05)
		кл/мкл	157,25 ± 9,39	130,04–185,29	178,92 ± 11,53	143,77–213,66	0,78 (>0,05)

У детей с вирус-индуцированным фенотипом БА в периферической крови содержание лейкоцитов, нейтрофильных гранулоцитов, абсолютное число Т-лимфоцитов (CD3⁺CD19⁻), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺) достоверно выше (p < 0,001), чем у детей с аллерген-индуцированным фенотипом болезни (см. табл. 2). В данной группе у детей абсолютное число Т-лимфоцитов с цитотоксическими функциями, натуральных киллеров и показатели экспрессии активационных маркеров (CD3⁺HLA-DR⁺) достоверно ниже показателей здоровых детей (при p < 0,05; p < 0,01; p < 0,05 соответственно, см. табл. 1, 2) в сочетании с низкой экспрессией на клетках Т-лимфоцитов CD95⁺ (2,76 ± 0,32)% (у здоровых (6,12 ± 0,28)% при p < 0,01).

У детей с реализацией аллерген-индуцированного фенотипа БА в периферической крови показатели содержания лейкоцитов, гранулоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и цитолитических клеток (NK-клетки CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺, NK-клетки CD3⁺/CD16⁺/CD56⁺) сопоставимы с данными здоровых сверстников (см. табл. 1, 2), при низкой экспрессии на клетках Т-лимфоцитов CD95⁺ (2,54 ± 0,28)% (у здоровых (6,12 ± 0,28)% при p < 0,01).

Показатели цитокинового спектра сыворотки крови детей с вирус-индуцированным фенотипом бронхиальной астмы составляли: ИФНγ (14,32 ± 1,22) пг/мл в ДИ 12,29–16,33 пг/мл; ИЛ-4 (18,60 ± 1,60) пг/мл в ДИ 16,83–23,16 пг/мл; ИЛ-6 (12,76 ± 1,27) пг/мл в ДИ 10,03–14,86 пг/мл; ИЛ-8 (34,55 ± 2,23) пг/мл в ДИ 30,843–8,26 пг/мл; ИЛ-13 (20,97 ± 0,94) пг/мл в ДИ 16,98–22,80 пг/мл.

У детей с реализацией аллерген-индуцированного фенотипа БА показатели сывороточного содержания цитокинов составляли: ИФНγ (19,31 ± ± 1,92) пг/мл в ДИ 16,13–22,50 пг/мл; ИЛ-4 (30,83 ± ± 0,58) пг/мл в ДИ 29,87–31,79 пг/мл; ИЛ-6 (5,85 ± ± 1,40) пг/мл в ДИ 4,15–9,96 пг/мл; ИЛ-8 (22,43 ± ± 2,30) пг/мл в ДИ 19,15–26,45 пг/мл; ИЛ-13 (31,93 ± 0,92) пг/мл в ДИ 30,40–33,46 пг/мл.

Исследования цитокин-продуцирующей активности клеток крови определили показатели спонтанной продукции ИФНγ и ИЛ-4 на уровне (4,75 ± 0,45) пг/мл и (1,69 ± 0,09) пг/мл у детей с вирус-индуцированным фенотипом БА и (11,38 ± ± 2,42) пг/мл и (1,76 ± 0,08) пг/мл при аллерген-индуцированном. После индукции митогеном показатели ИФНγ и ИЛ-4 у детей с вирус-индуцированным фенотипом БА составили (4,54 ± ± 0,39) пг/мл и (10,5 ± 1,8) пг/мл и при аллерген-индуцированном (22,54 ± 2,77) пг/мл и (27,64 ± ± 2,2) пг/мл соответственно.

Мониторинг содержания ИЛ-17А в сыворотке крови зафиксировал высокие уровни у детей с БА при вирус-индуцированном – (152,73 ± ± 12,32) пг/мл в ДИ 115,87–188,65 пг/мл и аллерген-индуцированном фенотипе болезни – (112,37 ± 12,94) пг/мл в ДИ 79,70–117,81 пг/мл при p < 0,01 соответственно. В обеих подгруппах не было значимых различий в показателях сывороточного содержания общего IgE (ДИ 280,81–457,74 МЕ/мл и 297,15–426,43 МЕ/мл при p > 0,05). Среднее содержание специфического (к бытовым и эпидермальным аллергенам) IgE в сыворотке крови у детей с аллерген-индуцированным фенотипом составляло (22,57 ± 2,72) МЕ/мл и (0,53 ± 0,04) МЕ/мл у детей с вирус-индуцированным фенотипом.

ОБСУЖДЕНИЕ

Клеточные популяции иммунной системы человека высокочувствительны и отражают реакции организма на негативное воздействие средовых физиологических или патологических факторов, активацию или истощение иммунной системы [9–12]. Цитотоксическим Т-лимфоцитам с фенотипом CD3⁺CD8⁺ принадлежит ведущая роль в специфической защите организма от внутриклеточных патогенов и собственных измененных клеток [12, 13]. Эффекторные свойства цитотоксические Т-лимфоциты реализуют через синтез цитокинов, секреторную дегрануляцию и высво-

бождение перфорина и гранзимов, определяются уровнем зрелости или стадией дифференцировки клетки [10, 11, 13]. Пролиферативный потенциал цитотоксических Т-лимфоцитов обеспечивается высокой плотностью мембранных рецепторов к ИЛ-2 (CD25) [14]. Интенсивность иммунных реакций, процессов пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, нормальное функционирование иммунной системы обеспечиваются балансом продукции и акцепции цитокинов, образующих цитокиновую сеть. Исследования последних лет зафиксировали дисбаланс в системе интерферонов, функциональные изменения интерферон-продуцирующих клеток, влияющих на эффективность противовоспалительной терапии различных фенотипов БА у детей [2, 3, 5, 6, 15]. Интерлейкины 4, 13 и 17А оппозиционно с ИФН γ поддерживают баланс Th1/Th2/Th17, регулируют апоптоз нормальных, инфицированных и трансформированных клеток, обеспечивают иммунорегуляторный, противовирусный и антипролиферативный эффекты [2, 4, 6, 15].

С. Дое с соавт. (2010) отметили, что ИЛ-17А не ассоциирован с нейтрофильным воспалением, а усиливает эозинофильное воспаление дыхательных путей, опосредованное Th-2, у пациентов с бронхиальной астмой [16]. I. Agache с соавт. (2010) выявили, что повышенный уровень сывороточного ИЛ-17 является независимым фактором риска тяжелой астмы [17]. Цитокины Th-2-клеток ИЛ-4 и ИЛ-13 регулируют синтез IgE, и при моделировании астмы на животных выявлена способность ИЛ-5 и ИЛ-17 привлекать эозинофилы в дыхательные пути. A. Mubessel (2013) отметил, что выявленное у людей сочетанное участие лимфоцитов Th-2 и Th-17 в реализации бронхиальной астмы более значимо по сравнению с вовлечением только Th-2-клеток [18]. Вирусные и бактериальные инфекции могут индуцировать развитие бронхиальной астмы через активацию клеток врожденного (макрофаги, естественные киллеры) и адаптивного иммунитета Th-1 и Th-17. Клетки Th-17 и продуцируемые ими цитокины задействованы в защите от инфекционных агентов, и выявлено их участие в развитии хронического воспаления при БА [8, 15, 18]. Маркер поздней и длительной активации клеток HLA-DR, его экспрессия наиболее полно отражают активационное состояние клеток [9]. Проведенные исследования отметили усиление экспрессии активационных маркеров регуляции распознавания антигенов, запуска и реализации иммунного ответа, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми

сверстниками и вариативность показателей активации, пролиферации и регуляции эффекторных реакций иммуногенеза у детей с реализацией различных фенотипов болезни.

Исследования показателей врожденного и адаптивного иммунного ответа у детей с вирус-индуцированным фенотипом БА выявили снижение абсолютного числа Т-лимфоцитов с цитотоксическими функциями, экспрессию активационных маркеров (CD3⁺HLA-DR⁺) в сочетании с низкой экспрессией молекулы CD95⁺ на Т-лимфоцитах (участвующей в поддержании клонального баланса лимфоидных клеток и предотвращении избыточной активации иммунной системы), дефицит NK- и NKT-клеток, активацию синтеза цитокинов профиля Th-2 и Th-17, угнетение индукционного потенциала синтеза клетками ИФН γ с регуляторным коэффициентом $K_{\text{ИФН}\gamma/\text{ИЛ-4}} = 2,06 \pm \pm 0,19$. У детей с аллерген-индуцированным фенотипом БА определены снижение абсолютного числа лимфоцитов, Т-лимфоцитов, усиление экспрессии активационных маркеров инициации иммунного ответа (CD25⁺) и эффекторного реагирования (HLA-DR⁺), низкое обеспечение NK-клеток при сохранении числа NKT-клеток на уровне здоровых сверстников, активация синтеза цитокинов Th-2 ($K_{\text{ИФН}\gamma/\text{ИЛ-4}} = 1,08 \pm 0,09$) с высоким ответом выработки ИЛ-4 на митоген и низким уровнем индукционной выработки ИФН γ клетками периферической крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования отметили усиление экспрессии активационных маркеров регуляции распознавания антигенов, запуска и реализации иммунного ответа, пролиферации и дифференцировки лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми сверстниками и различия показателей врожденного и адаптивного иммунного ответа у детей с реализацией вирус-индуцированного и аллерген-индуцированного фенотипов болезни. При вирус-индуцированном фенотипе БА у детей выявлены количественные и функциональные нарушения клеточной цитотоксичности, высокое содержание цитокинов профилей Th2 и Th17 (интерлейкины 4, 6, 8, 13, 17А) в сыворотке крови, угнетение индуцированной выработки ИФН γ клетками крови, что можно отнести к факторам, предрасполагающим к длительной персистенции вирусных инфекций в дыхательных путях и инициации сенсibilизации организма с развитием эозинофильного воспаления. У детей с реализацией аллерген-индуцированного фенотипа показатели

противовирусного иммунитета соответствуют возрастной норме, отмечены активация синтеза цитокинов Th2-профиля, снижение регуляторного коэффициента $K_{ИФН\gamma/ИЛ-4}$, изменения в системе адаптивного реагирования с усилением пролиферации, угнетением процессов негативной регуляции, высокий синтез IgE.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ И ВКЛАД АВТОРОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи, и сообщают о вкладе авторов. Просекова Е.В. – разработка концепции и дизайна исследования, интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания, внесение принципиальных изменений, окончательное утверждение версии, которая сдается в печать. Ситдикова Т.С. – разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных. Долгополов М.С. – подготовка текста статьи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Турянская А.И. – анализ и интерпретация данных. Сабыныч В.А. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания. Забелина Н.Р. – подготовка текста статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Клиническое исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266. Дизайн исследования одобрен междисциплинарным комитетом по этике Тихоокеанского государственного медицинского университета (протоколы № 7 от 23.06.2014 г., № 8 от 24.04.2015 г.)

ЛИТЕРАТУРА

- Bacharier L., Boner B.A., Carlsen K.-H. et al. The European Pediatric Asthma Group Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report // *Allergy*. 2008; 63: 5–34.
- Agache C., Akdis C., Jutel M., Virchow J. S. Untangling asthma phenotypes and endotypes // *European J. of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 67: 835–846.
- Wenzel S. Phenotypes & endotypes: emerging concepts on asthma heterogeneity // *Global atlas of Asthma*. 2013; 34–36.
- Курбачева О.М., Павлова К.С. Фенотипы и эндотипы бронхиальной астмы: от патогенеза и клинической картины к выбору терапии // *Российский аллергологический журнал*. 2013; 1: 15–24.
- Мицкевич С.Э. Фенотипы бронхиальной астмы у детей и дифференцированная тактика диагностики и лечения // *Вестник Челябинского государственного университета*. 2014; 4 (333): 79–85.
- Fitzpatrick A.M., Baena-Cagnani C.E., Bacharier L.B. Severe Asthma in Childhood: Recent Advances in Phenotyping and Pathogenesis // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 12 (2): 193–201.
- Poulsen L.K. Cytokines in allergy // *Global Atlas of Allergy*. 2014; 69–71.
- Willem van de Veen., Mübcecel Akdis. Mechanisms of immune regulation in allergy // *Global Atlas of Allergy*. 2014; 90–91.
- Литвинова Л.С., Гуцол А.А., Сохоневич Н.А., Кофанова К.А., Хазиахматова О.Г., Шуплецова В.В., Кайгородова Е.В., Гончаров А.Г. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов // *Медицинская иммунология*. 2014; 16 (1): 7–26.
- Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2015; 2: 30–35.
- Троценко А.А. Особенности формирования иммунитета на разных этапах жизненного цикла человека // *Международный научно-исследовательский журнал*. 2015; 6–2 (37): 40–42. DOI: 10.18454/IRJ.2227-6017.
- Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010: 752.
- Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии // *Медицинская иммунология*. 2015; 17 (6): 525–538.
- Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A.L., Gastl G., Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells // *Immunobiology*. 2003; 207 (2): 85–93.
- Cezmi A. Akdis. Global atlas of asthma. Switzerland: Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2013: 2–179.
- Doe C., Bafahel M., Siddiqui S. et al. Expression of the T-helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD // *CHEST*. 2010; 138 (5): 1140–1147.
- Agache I., Ciobanu C., Agache C., Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma // *Respiratory Medicine*. 2010; 104: 1131–1137.
- Mubcecel A. The pathogenesis of asthma // *Global atlas of asthma*. 2013; 28–30.

Поступила в редакцию 07.03.2017

Утверждена к печати 10.05.2017

Просекова Елена Викторовна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ТГМУ, г. Владивосток.

Ситдикова Татьяна Сергеевна, врач аллерголог-иммунолог, зав. отделением, Владивостокский клинико-диагностический центр, г. Владивосток.

Долгополов Максим Сергеевич, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, аспирант, ТГМУ, г. Владивосток.

Турьянская Алина Ивановна, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, аспирант, ТГМУ, г. Владивосток.

Сабыныч Виталий Александрович, канд. мед. наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ТГМУ, г. Владивосток.

Забелина Наталья Робертовна, канд. мед. наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ТГМУ, г. Владивосток.

(✉) Просекова Елена Викторовна, e-mail: pros.ev@mail.ru.

УДК 616.248-053.2-02-097

DOI 10.20538/1682-0363-2017-2-170-179

For citation: Prosekova E.V., Sitdikova T.S., Dolgoplov M.S., Turyanskaya A.I., Sabynych V.A., Zabelina N.R. Parameters of innate and adaptive immune response in children with virus-induced and allergen-induced bronchial asthma phenotypes. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2017; 16 (2): 170–179

Parameters of innate and adaptive immune response in children with virus-induced and allergen-induced bronchial asthma phenotypes

Prosekova E.V.¹, Sitdikova T.S.², Dolgoplov M.S.¹, Turyanskaya A.I.¹, Sabynych V.A.¹, Zabelina N.R.¹

¹ Pacific State Medical University

2, Ostryakova Av., Vladivostok, 690002, Russian Federation

² Vladivostok Clinical and Diagnostic Centre

10, Sportivnaya Str., Vladivostok, 690001, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To analyze the immune mechanisms of activation of virus-induced and allergen-induced bronchial asthma phenotypes in children.

Materials and methods. We have performed an integrated assessment of parameters of innate and acquired immunity in 98 children with bronchial asthma (BA) at the age of 3–11 years in groups with virus-induced ($n = 49$) and allergen-induced ($n = 49$) phenotypes. Bronchial asthma phenotypes were verified in accordance with PRACTALL international consensus report (2008). Study exclusion criteria were: severe course of bronchial asthma and application of immunocorrecting drugs during preceding six months. To analyze immune competent cells we used flow cytometer COULTER EPICS XL by Beckman Coulter Inc. Cytokine levels were identified using immunoenzyme method and reagents by R & D Diagnostics Inc. (USA); IgE – using reagents by Alkor Bio company (Saint-Petersburg); production of cytokines – using reagents by Vektor-Best (Novosibirsk city). Statistical processing of data was performed by Statistica. 10 program with critical significance level $p < 0,05$, correlations were analyzed using Spearman rank correlation coefficient.

Results. Children with bronchial asthma showed enhanced expression of T-lymphocyte activation marker HLA-DR⁺ ($p < 0,05$) with reduced level of CD3⁺CD95⁺ ($p < 0,01$), high level of serum IgE ($p < 0,01$), the inverse correlation between serum levels of IFN γ and IgE ($r = -0,16$), IFN γ and IL-13 ($r = -0,25$), direct correlation between IL-17A and IgE ($r = 0,48$), IgE and IL-13 ($r = 0,56$). The children with allergen-induced BA phenotype showed low expression of CD95⁺ on T-lymphocyte cells, predominance of Th-2 profile cytokines, high mitogen-induced production of IL-4 and low induction of IFN γ production. Levels of cytotoxic T-lymphocytes, natural killers, expression of activation markers and CD95⁺ on T-lymphocyte

cells and mitogen-induced synthesis of IFN γ by cells in children with virus-induced BA phenotype were lower than the same indices in healthy children (at $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,01$). Levels of leucocytes, neutrocytes, absolute number of T-lymphocytes, T-helpers, B-lymphocytes ($p < 0,001$) and Th-2 – Th-17 cytokine profile in blood serum in this group were higher than the same indices in children with allergen-induced phenotype.

Conclusion. Children with virus-induced BA phenotype showed presence of immune-mediated factors predisposing them to persistent viral infections and initiation of body sensibilization with development of eosinophilic inflammation, such as impairment of cellular cytotoxicity, predominance of Th-2 – Th-17 profile cytokines, inhibition of induction of IFN γ production by blood cells. The changes of the adaptive response system in children with activation of allergen-induced BA phenotype are characterized by enhanced proliferation, inhibition of negative regulation processes, activation of synthesis of Th2 profile cytokines, and enhanced synthesis of IgE.

Key words: immune mechanisms, virus-induced, allergen-induced phenotypes, bronchial asthma, children.

REFERENCES

1. Bacharier L., Boner B.A., Carlsen K.-H. et al. The European Pediatric Asthma Group Diagnosis and treatment of asthma in childhood: a PRACTALL consensus report // *Allergy*. 2008; 63: 5–34.
2. Agache C., Akdis C., Jutel M., Virchow J. S. Untangling asthma phenotypes and endotypes // *European J. of Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 67: 835–846.
3. Wenzel S. Phenotypes & endotypes: emerging concepts on asthma heterogeneity // *Global atlas of Asthma*. 2013; 34–36.
4. Kurbacheva O.M., Pavlova K.S. Fenotipy i endotipy bronkhial'noy asthmy: ot patogeneza i klinicheskoy kartiny k vyboru terapii [Phenotypes and endotypes of bronchial asthma: from pathogenesis and clinical features to therapy] // *Rossiyskiy allergologicheskiiy zhurnal – Russian Allergology Journal*. 2013; 1: 15–24 (in Russian).
5. Mitskevich S.E. Fenotipy bronkhial'noy asthmy u detey i differentsirovannaya taktika diagnostiki i lecheniya [Asthma phenotypes in children and differential tactic of diagnostic and treatment] // *Vestnik Chelyabinskogo gosudarstvennogo universiteta. – Bulletin of Chelyabinsk State University*. 2014; 4 (333): 79–85 (in Russian).
6. Fitzpatrick A.M., Baena-Cagnani C.E., Bacharier L.B. Severe Asthma in Childhood: Recent Advances in Phenotyping and Pathogenesis // *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 2012; 12 (2): 193–201.
7. Poulsen L.K. Cytokines in allergy // *Global Atlas of Allergy*. 2014; 69–71.
8. Willem van de Veen., Mubecel Akdis. Mechanisms of immune regulation in allergy // *Global Atlas of Allergy*. 2014; 90–91.
9. Litvinova L.S., Gutsol A.A., Sokhnevich N.A., Kofanova K.A., Khaziakhmatova O.G., Shupletsova V.V., Kaygorodova E.V., Goncharov A.G. Osnovnye poverkhnostnye markery funktsional'noy aktivnosti T-limfotsitov [Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes] // *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology*. 2014; 16 (1): 7–26 (in Russian).
10. Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshchikov A.V. Analiz urovnya ekspressii CD56 i CD57 tsitotoksicheskimi T-limfotsitami razlichnogo urovnya differentsirovki [CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic T lymphocytes] // *Tikbookeanskiy meditsinskiy zhurnal – Pacific Medical Journal*. 2015; 2: 30–35 (in Russian).
11. Trotsenko A.A. Osobennosti formirovaniya immuniteta na raznykh etapakh zhiznennogo tsikla cheloveka [Peculiarities of immunity formation at different stages of human life-cycle] // *Mezhdunarodnyy nauchno-issledovatel'skiy zhurnal – International Research Journal*. 2015; 6–2 (37): 40–42. DOI: 10.18454/IRJ.2227-6017 (in Russian).
12. Yarilin A.A. Immunologiya [Immunology]. M.: GEOTAR-Media Publ., 2010: 752 (in Russian).
13. Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K. Opredelenie osnovnykh subpopulyatsiy tsitotoksicheskikh T-limfotsitov metodom mnogotsvetnoy protochnoy tsitometrii [Multicolor flow cytometric analysis of cytotoxic T cell subsets] // *Meditsinskaya immunologiya – Medical Immunology*. 2015; 17 (6): 525–538 (in Russian).
14. Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A.L., Gastl G., Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptor CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells // *Immunobiology*. 2003; 207 (2): 85–93.
15. Cezmi A. Akdis. Global atlas of asthma. Switzerland: Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology, 2013: 2–179.
16. Doe C., Bafahel M., Siddiqui S. et al. Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD // *CHEST*. 2010; 138 (5): 1140–1147.
17. Agache I., Ciobanu C., Agache C., Anghel M. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma // *Respiratory Medicine*. 2010; 104: 1131–1137.
18. Mubecel A. The pathogenesis of asthma // *Global atlas of Asthma*. 2013; 28–30.

Received March 07.2017

Accepted May 10.2017

Prosekova Elena V., DM, Professor, Head of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Sitdikova Tatiana S., Allergist and Clinical Immunologist, Head of the Department of Vladivostok Clinical and Diagnostic Centre, Postgraduate Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Dolgoplov Maxim S., Teaching Assistant of Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Postgraduate Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Turyanskaya Alina I., Teaching Assistant Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Postgraduate Student, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Sabynych Vitaly A., PhD, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

Zabelina Natalia R., PhD, Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics and General and Clinical Immunology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation.

(✉) **Prosekova Elena V.**, e-mail: pros.ev@mail.ru.