

Оригинальные работы

УДК 612.017.11

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ СЫВОРОТКИ КРОВИ И СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Просекова Е.В., Турянская А.И., Плехова Н.Г., Долгополов М.С., Сабыныч В.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации; РФ, 690002, г. Владивосток, пр-кт Острякова, д. 2

Ключевые слова: субпопуляции Т-лимфоцитов, цитокиновый профиль, бронхиальная астма, аллергический ринит, дети

Расширение спектра изучаемых клонов Т-хелперов определило более сложные иммунные механизмы реализации аллергического воспаления.

Цель. Характеристика показателей и взаимосвязей цитокинового профиля сыворотки и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови у детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом. **Материалы и методы.** Проведено комплексное обследование 150 детей в возрасте 3–11 лет с верифицированным диагнозом бронхиальной астмы, аллергического ринита и 30 здоровых сверстников. Иммунологические параметры крови оценивали методом проточной цитометрии, концентрации интерлейкинов и IgE в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа. При статистической обработке использовали программы «Statistica 10» с критическим уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты. У детей с аллергическими заболеваниями в сыворотке крови определены высокие уровни содержания интерлейкинов-4, -8, -13, -17А, сопоставимый с показателями группы контроля уровень IL-17F и низкое содержание IFN- γ . При бронхиальной астме и аллергическом рините у детей выявлено увеличение количества CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ Т-лимфоцитов и CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов и повышение количество Th17 при снижении CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ клеток памяти. В группе здоровых детей популяция Th17 составляла 9,49±1,6%, у детей с аллергическими заболеваниями количество данных клеток было значимо выше – 14,5±0,77% ($p < 0,001$). Анализ сывороточного содержания цитокинов у детей с изолированным течением БА и в сочетании с аллергическим ринитом выявил разнонаправленные корреляции, отличающиеся по силе и направленности от таковых в группе здоровых детей.

Заключение. У детей при изолированном течении бронхиальной астмы и в сочетании с аллергическим ринитом выявлены: сопоставимое с показателями здоровых детей количество CD3⁺CD4⁺ Т-клеток, дисбаланс в субпопуляционном составе Т-хелперов за счет преобладания Th2 и Th17, активация синтеза IL-17А, IL-4, IL-8, IL-13, низкий уровень сывороточного IFN- γ , изменения силы и направленности взаимосвязей цитокинового профиля и спектра субпопуляций Т-лимфоцитов.

Введение

В большинстве стран распространенность бронхиальной астмы и аллергического ринита возрастает, особенно среди детей [1–3]. В последние десятилетия значительное число отечественных и зарубежных работ посвящено изучению роли нарушений иммунного гомеостаза в реализации аллергических заболеваний человека [4–9].

Адрес для корреспонденции

Просекова Елена Викторовна
E-mail: pros.ev@mail.ru

В парадигме основной иммунной дисрегуляции при аллергических заболеваниях отмечена ключевая роль Т-лимфоцитов и патогенетическое значение дисбаланса субпопуляций Т-хелперов. Ответственные за формирование клеточно-опосредованного и приобретенного типов иммунного ответа высокодифференцированные субпопуляции Т-лимфоцитов – хелперы (Th), выделяются особенным разнообразием выполняемых функций, фенотипической гетерогенностью и способностью перехода из одной популяции в другую в зависимости от микроокружения, типа получаемых цитокиновых сигналов и широкого спектра других факторов [10–14].

Согласно современным представлениям, дифференцировка наивных Т-клеток в функционально полноценные эффекторы сопровождается приобретением характерного цитокинового профиля, определяющего их функциональную активность. Методологические технологии, основанные на способности Т-лимфоцитов продуцировать различные цитокины, позволяют исследовать отдельные субпопуляции клеток.

При аллергических заболеваниях дисбаланс в регуляции иммунного ответа на антиген сопровождается снижением супрессорной активности регуляторных Т-клеток, продукцией специфических антител иммуноглобулина (Ig) Е или развитием реакции гиперчувствительности замедленного типа и реализации аллергического воспаления. Иммунный ответ второго типа чрезвычайно сложен и неоднороден, включает несколько детерминант с нелинейными динамическими взаимодействиями. В процессе формирования иммунного ответа при аллергических заболеваниях принимают участие все основные и вспомогательные иммунокомпетентные клетки, различающиеся по антигенам главного комплекса гистосовместимости и продуцируемым цитокинам [6, 8–11, 13–16]. Смешанный иммунный ответ второго типа реализуется с участием Т-хелперов Th2, В₂-лимфоцитов, врожденных лимфоидных клеток 2-й группы, естественных клеток-киллеров, естественных Т-клеток-киллеров, базофилов, эозинофилов и тучных клеток, а также продуцируемых ими цитокинов. Последние определяют выживаемость клеток, стимуляцию или ингибирование их роста, дифференцировку, функциональную активацию и апоптоз клеток. Уровни цитокинов в биологических жидкостях отражают состояние иммунной системы. Изменения профиля и/или дисбаланс продукции про- и противовоспалительных цитокинов, стимулирующих рост лимфоцитов, образующих регуляторную сеть субпопуляций Т-лимфоцитов, определяют иммунопатогенетические механизмы и реализуют фенотипические особенности аллергических заболеваний [3, 14–19].

Актуальность изучения показателей регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов и цитокинового профиля, позволяющих получить информацию о функциональной активности иммунокомпетентных клеток, направленности иммунного ответа, соотношении процессов активации субпопуляций Т-лимфоцитов, природе, тяжести и топике воспалительного процесса, определила цель настоящего исследования.

Цель исследования включала характеристику показателей и взаимосвязей цитокинового профиля сыворотки и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови у детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом.

Задачи исследования

1. Определение содержания цитокинов в сыворотке крови (интерлейкины (IL)-4, -8, -13, -17A, -17F, интерферона-гамма (IFN- γ) у детей с изолированным течением аллергической бронхиальной астмы в сочетании с аллергическим ринитом и здоровых сверстников

2. Исследование показателей количественного содержания Т-лимфоцитов и субпопуляции (CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD3⁺CD25⁺, CD3⁺CD4⁺CCR6⁺) в периферической крови детей с изолированным течением аллергической бронхиальной астмы в сочетании с аллергическим ринитом и здоровых сверстников.

3. Изучение корреляции содержания цитокинов в сыворотке крови и структуры популяционного профиля Т-лимфоцитов у детей с изолированным течением аллергической бронхиальной астмы в сочетании с аллергическим ринитом и здоровых сверстников.

Дизайн исследования одобрен Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (ректор В.Б. Шуматов), протокол № 7 от 23.06.2014 г., информированные согласия подписаны родителями.

Материалы и методы

В исследовании наблюдались 180 детей от 3 до 11 лет – 150 детей с верифицированным диагнозом аллергической бронхиальной астмы (у 110 в сочетании с аллергическим ринитом) и 30 здоровых сверстников. Верификация заболевания проводилась в соответствии с национальной программой «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2017) и международными согласительными документами «Global strategy for asthma management and prevention» (2018) и ARIA (2019) [1, 20, 21]. Критериями исключения из исследования являлись интермиттирующее и тяжелое течение бронхиальной астмы, приступный период бронхиальной астмы, применение в 6 предшествующих месяцев иммунокорректирующих препаратов. Комплексное клиничко-лабораторное обследование и наблюдение проведено на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии и в центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России. Материалом для определения иммунологических параметров являлась венозная кровь. Подготовку образцов периферической крови и настройку проточного цитофлуориметра проводили в соответствии с национальными рекомендациями [22]. Исследовали следующие показатели: Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺), цитотоксические Т-клетки (CD3⁺CD8⁺), В-лимфо-

циты (CD19⁺), экспрессию дифференцировочного антигена CD45 с изоформами RA и RO (клон T6D11 и REA611 соответственно, Miltenyi Biotec GmbH, Германия) на субпопуляциях наивных Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺), «терминально-дифференцированные» CD45RO⁻ позитивные Th-клетки памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺), а также несущих две изоформы дубль-позитивные переходные Th-клетки (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺). Th17-клетки идентифицировали как CD3CD4 позитивные с добавочным сигналом на наличие экспрессии рецептора к хемокину CCR6, специфичному для Th17-клеток (CD196 (CCR6)-APC, клон REA277; Miltenyi Biotec GmbH, Германия) [23]. Для определения внутриклеточного содержания интерлейкина-17 (IL-17) использовали моноклональные антитела против IL-17A (клон REA1063), меченные PE-Vio770, изотипический контроль антитела против REA (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Пермеабиллизацию клеток проводили с использованием Inside Perm раствора (Miltenyi Biotec GmbH, Германия). Подбор оптимальных комбинаций антител и конъюгированных с ними флуорохромов проводили на основании принципов, изложенных в литературе [24]. Окрашивание моноклональными антителами одновременно для поверхностных и внутриклеточных маркеров производили в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Для исключения неспецифического связывания моноклональных антител использовался соответствующий флуорохромконъюгированный изотипический контроль. Для поправки на неспецифическое окрашивание из полученного значения вычитали процент клеток, позитивных при окраске изотипконтролем.

Субпопуляции лимфоцитов определяли методом мультицветной проточной цитометрии, используя автоматический цитофлуориметр MACSQuant TM Analyzer 10 (Miltenyi Biotec GmbH, Германия), оснащенный тремя диодными лазерами – 405, 488 и 638 нм. Данные анализировали, набирая не менее 30 000 лейкоцитов в образце. Популяция CD3⁺ PE-меченных лимфоцитов гейтировалась с использованием флуоресцентного канала (FL3) и параметра бокового светорассеяния (SSC). Соответственно двухпараметровые дот-плоты были созданы для оценки процентного содержания CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (Th naive), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (Them, эффекторные Т-клетки памяти), CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁺ (Theff), CD3⁺CD4⁺CD196⁺ (Th17CD196⁺) и CD3⁺CD4⁺IL17A⁺ (ThIL17A). Изотипический контроль использовали для подтверждения специфичности моноклональных антител. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ MACSQuantify™ Software v. 2.5

(Miltenyi Biotec GmbH, Германия) и Kaluza™ v. 1.2 (Beckman Coulter, США).

Концентрации интерлейкинов и IgE в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реактивов, согласно прилагаемой инструкции (интерлейкинов – в пг/мл, реактивами eBiosciens, Bender Medsystems GmbH, Австрия; IgE – в МЕ/мл, ООО «Компания Алкор Био», Санкт-Петербург).

При статистической обработке использовали программное обеспечение Statistica 10.0 (StatSoft, США) и GraphPad Prism 4.00 for Windows (GraphPad Prism Software Inc., США). Нормальность распределения проверяли по критерию согласия Пирсона χ^2 (при нормальном распределении показателей и коэффициенте вариации CV $\leq 30\%$) и непараметрической (при распределении отличном от нормального и коэффициенте вариации CV $> 30\%$). Результаты выражали в виде средней арифметической (M), средней ошибки средней арифметической ($\pm m$), среднего квадратичного отклонения ($\pm \sigma$), медианы (Me), верхнего и нижнего квартиля [(LQ; HQ) 25%; 75%], 95% доверительного интервала (ДИ), коэффициента достоверности показателя (t) и различий (t и p). Использовали методы корреляционного анализа (критерий χ^2 и однофакторного дисперсного анализа – критерий Фишера, и r – коэффициента корреляции с оценкой силы корреляционной связи по шкале Чеддока), подсчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена с проверкой нормальности распределения значений признака (Shapiro–Wilks). Объем выполненных исследований и использование соответствующих статистических методов позволили оценить результаты с достоверностью и критическим уровнем значимости $p < 0,05$.

Результаты

В контрольной группе здоровых детей показатели интерлейкинов в сыворотке крови варьировали в диапазоне от нескольких единиц (IL-4, IL-8, IL-13) до нескольких десятков (IL-17A, IL-17F, IFN- γ) пикограмм в миллилитре (табл. 1) с доверительными интервалами (ДИ) IL-4 – 1,44–1,54 пг/мл; IL-8 – 2,41–3,18 пг/мл; IL-13 – 4,34–5,78 пг/мл; IL-17A – 21,78–25,69 пг/мл; IL-17F – 24,51–26,89 пг/мл; IFN- γ – 28,62–30,58 пг/мл. При исследовании сыворотки крови у детей с аллергическими заболеваниями (АЗ) органов дыхания определены более высокие доверительные интервалы интерлейкинов: IL-4 – 5,77–6,33 пг/мл; IL-8 – 5,19–6,01 пг/мл; IL-13 – 15,23–17,01 пг/мл; IL-17A – 129,12–148,26 пг/мл, сопоставимые показатели сывороточного содержания IL-17F – 25,31–39,41 пг/мл и уровень IFN- γ достоверно ниже, чем в группе контроля, – 5,11–5,74 пг/мл, (28,68–30,58 пг/мл соответственно при $p < 0,001$) (см. табл. 1).

Таблица 1. Концентрация цитокинов в сыворотке крови детей с аллергическими заболеваниями (АЗ) органов дыхания и здоровых сверстников [Ме (LQ-HQ) в пг/мл]

№ п/п	Цитокиновый профиль	Группы наблюдения		Достоверность различий показателей между группами (t, p)
		Дети с АЗ органов дыхания (n=150)	Здоровые дети (n=30)	
1	IL-4	6,40 (5,70–7,50)	1,50 (1,40–1,60)	5,4384 p<0,001
2	IL-8	5,50 (3,13–7,80)	2,50 (1,63–3,98)	2,2604 p<0,05
3	IL-13	13,60 (12,05–18,80)	4,90 (2,50–7,03)	4,0766 p<0,001
4	IL-17A	117,40 (98,70–143,00)	23,90 (20,10–27,60)	4,0766 p<0,001
5	IL-17F	28,91 (25,31–39,41)	25,50 (22,60–28,58)	1,2286 p>0,1
6	IFN- γ	5,35 (3,50–7,18)	29,85 (27,75–31,58)	21,9220 p<0,001

У детей при изолированном течении бронхиальной астмы (БА) и в сочетании с аллергическим ринитом (БА+АР) выявлено увеличение концентрации интерлейкинов-4, -8, -13 и -17А при снижении продукции интерферона-гамма без значимых различий в зависимости от распространенности аллергического воспаления (табл. 2). При сочетанном течении аллергической бронхиальной астмы и аллергического ринита у детей доверительные интервалы содержания цитокинов в сыворотке крови определялись в следующих диапазонах: IL-4 – 5,836–6,503 пг/мл; IL-8 – 5,166–6,145 пг/мл; IL-13 – 15,218–17,476 пг/мл; IL-17А – 131,221–146,623 пг/мл; IL-17F – 34,856–40,127 пг/мл, IFN- γ – 4,954–5,705 пг/мл.

Исследование взаимосвязей содержания цитокинов в сыворотке крови у здоровых детей выявило

значимые корреляции: прямую умеренной силы уровней IL-17А и IL-4 ($r=0,349$), обратную умеренной силы IL-17F и IL-8 ($r=-0,383$), обратную слабую показателей IFN- γ с IL-4, IL-8 и IL-13 ($r=-0,198$, $r=-0,159$, $r=-0,175$ соответственно).

Анализ содержания цитокинов в сыворотке крови у детей с изолированным течением БА и в сочетании с аллергическим ринитом выявил разнонаправленные корреляции, отличающиеся по силе и направленности от таковых в группе здоровых детей (табл. 3). Прямые слабой силы корреляции отмечены между показателями IL-17А и IL-17F, IL-13 и IL-4. Обратной направленности взаимосвязи выявлены между IL-4 с IL-8 и IL-17F, IL-8 с IL-17А и IFN- γ , IL-13 с IL-17F и IFN- γ , при достоверности отрицательной корреляции показателей IL-17F с IL-4 и IFN- γ .

Таблица 2. Содержание цитокинов в сыворотке крови детей с изолированным течением бронхиальной астмы и в сочетании с аллергическим ринитом [Ме (LQ-HQ) в пг/мл]

№ п/п	Цитокины	Группы наблюдения		Достоверность различий показателей между группами (t, p)		
		I. Дети с БА (n=40)	II. Дети с БА+АР (n=110)	I и II	I и контроль (здоровые дети)	II и контроль (здоровые дети)
1	IL-4	6,40 (5,40–6,70)	6,45 (4,83–7,70)	0,698 p>0,1	9,8765 p<0,001	6,3564 p<0,001
2	IL-8	5,55 (5,40–6,70)	5,35 (3,13–7,88)	0,2360 p>0,1	4,4792 p<0,001	2,5868 p<0,05
3	IL-13	13,55 (12,50–18,73)	13,7 (11,70–20,48)	0,419 p>0,1	6,3797 p<0,001	4,4595 p<0,001
4	IL-17A	102,80 (96,33–137,08)	119,50 (101,90–143,00)	0,039 p>0,1	4,1630 p<0,001	4,9591 p<0,001
5	IL-17F	29,57 (24,72–37,67)	28,85 (25,54–40,29)	0,093 p>0,1	0,8692 p>0,1	1,4792 p>0,1
6	IFN- γ	5,85 (3,68–7,43)	5,30 (3,68–7,43)	0,4811 p>0,1	31,3693 p<0,001	24,1044 p<0,001

Таблица 3. Значения коэффициента корреляции (r) содержания цитокинов в сыворотке крови детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания (n=140)

№ п/п	Спектр цитокинов	IL-4	IL-8	IL-13	IL-17A	IL-17F	IFN-γ
1	IL-4		-0,018	0,133	0,039	-0,186	0,058
2	IL-8	-0,018		0,013	-0,045	0,019	-0,096
3	IL-13	0,133	0,013		0,073	-0,054	-0,0003
4	IL-17A	0,039	-0,045	0,073		0,271	-0,036
5	IL-17F	-0,186	0,019	-0,054	0,271		-0,165
6	IFN-γ	0,058	-0,096	-0,0003	-0,036	-0,165	

В гемограмме у детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом отмечены сопоставимые с группой здоровых детей доверительные интервалы абсолютного числа лейкоцитов ($6,9-7,94 \times 10^9/\text{л}$ и $6,8-7,86 \times 10^9/\text{л}$ соответственно при $t=0,352$ и $p>0,05$), преобладание гранулоцитов ($3,75-4,48 \times 10^9/\text{л}$ и $3,12-3,80 \times 10^9/\text{л}$ соответственно при $t=2,32$ и $p<0,05$), снижение абсолютного числа лимфоцитов (табл. 4).

Показатели субпопуляций $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD45RO^+$ у детей с бронхиальной астмой и аллергическим ринитом значимо ($p<0,001$) превышали таковые у здоровых сверстников (табл. 5). Отмечена тенденция к повышению дифференцированной популяции $CD3CD4$ позитивных Т-хелперов у детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания ($p<0,05$), обнаружено повышение количества Th-клеток эффекторного типа, экспрессирующих

Таблица 4. Характеристика популяционного состава лимфоцитов детей с аллергическими заболеваниями (АЗ) органов дыхания и здоровых сверстников ($M \pm \sigma$)

№ п/п	Показатели и единицы измерения		Группы наблюдения		Критерий Стьюдента, вероятность ошибки t p
			Дети с БА+АР (n=110) ($M \pm \sigma$)	Здоровые дети (n=30) ($M \pm \sigma$)	
1	Лимфоциты	%	$38,573 \pm 6,902$	$44,390 \pm 5,741$	$1,720$ $p>0,05$
		$10^9/\text{л}$	$3,317 \pm 1,047$	$3,370 \pm 0,433$	$2,635$ $p<0,05$
2	Т-лимфоциты $CD3^+CD19^-$	%	$72,863 \pm 4,550$	$71,261 \pm 4,837$	$1,172$ $p>0,05$
		кл/мкл	$2310,834 \pm 603,337$	$2356,901 \pm 435,572$	$1,853$ $p>0,05$
3	Т цитотоксические $CD3^+CD4^-CD8^+$	%	$26,608 \pm 4,970$	$27,220 \pm 5,380$	$0,995$ $p>0,05$
		кл/мкл	$708,333 \pm 294,827$	$893,731 \pm 229,581$	$0,109$ $p>0,05$
4	Т-хелперы $CD3^+CD4^+CD8^-$	%	$41,389 \pm 7,817$	$39,910 \pm 6,536$	$1,289$ $p>0,05$
		кл/мкл	$1295,037 \pm 491,621$	$1335,910 \pm 358,441$	$1,017$ $p>0,05$

При исследовании популяционного и субпопуляционного состава Т-лимфоцитов не обнаружено статистически значимых различий удельного веса популяций $CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD4^-CD8^+$, $CD3^+CD8^+CD45RA^+$ и $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD45RO^-$.

одномоментно обе изоформы рецептора $CD45RA$ и $CD45RO$ ($p<0,01$). Удельный вес $CD3CD4CD45RO$ позитивных клеток памяти был значительно ниже у детей при бронхиальной астме в сочетании с аллергическим ринитом ($p<0,001$) при отсутствии разли-

Таблица 5. Субпопуляции Т-клеток в периферической крови детей с аллергическими заболеваниями (АЗ) органов дыхания и здоровых сверстников (M±m)

Фенотип Т-клеток (показатели, единицы измерения % от целевой популяции и абсолютного числа)		Группы наблюдения		
		Дети с БА+АР (n=50) (M±m)	Здоровые дети (n=20) (M±m)	Критерий Стьюдента, вероятность ошибки t, p
CD3 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻	%	38,95±2,70	64,30±7,40	3,218, p<0,01
	кл/мкл	7461,00±167,60	21710,00±278,00	43,895, p<0,001
CD3 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺	%	9,60±0,70	30,10±3,40	5,905, p<0,001
	кл/мкл	2619,00±165,30	7987,00±365,00	13,397, p<0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RA ⁺	%	22,20±0,80	21,50±0,67	0,670, p>0,05
	кл/мкл	6740,00±46,00	5740,00±89,50	9,937, p<0,001
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	%	9,50±0,62	7,80±0,36	2,371, p<0,05
	кл/мкл	2780,00±220,50	2060,90±230,80	2,252, p<0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁻ (Th naive)	%	28,70±1,80	27,60±4,10	0,245, p>0,05
	кл/мкл	7667,00±74,40	7377,00±47,40	3,287, p<0,01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁻ CD45RO ⁺ (Th em)	%	17,70±0,70	19,00±3,90	2,159, p<0,05
	кл/мкл	5238,00±33,30	5400,00±23,80	3,957, p<0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RA ⁺ CD45RO ⁺ (Th eff)	%	0,49±0,004	30,90±4,20	7,240, p<0,001
	кл/мкл	125,00±1,30	781,30±33,30	19,693, p<0,001
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD196 ⁺ (Th17)	%	14,50±0,77	9,49±1,60	3,864, p<0,001
	кл/мкл	127,00±7,20	93,00±9,30	2,890, p<0,01
CD3 ⁺ CD4 ⁺ IL17A ⁺ (Th17, IL-17A)	%	2,38±0,70	0,53±0,08	4,887, p<0,001
	кл/мкл	20,84±5,13	5,19±0,41	3,040, p<0,01

чий между группами по абсолютному числу клеток данной субпопуляции в периферической крови. Количество CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺ Т-лимфоцитов было значительно выше у детей с БА и АР (p<0,025), чем у здоровых детей. В группе здоровых детей популяция Th17 (CD3⁺CD4⁺CD196⁺ лимфоциты) составляла 9,49±1,6% от CD3⁺CD4⁺ клеток и была значимо выше 14,5±0,77% у детей при БА с АР (p<0,001) с сохранением данных различий в абсолютных показателях (p=0,002; см. табл. 5).

В группе здоровых сверстников отмечены разнонаправленные корреляции умеренной силы сывороточного содержания IL-17A и субпопуляций Т-лимфоцитов: прямая с CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺CD196⁺ (r=0,321 и r=0,406 соответственно), обратная с CD3⁺CD4⁺ (r=-0,306). Определена прямая корреляция уровня IFN-γ и количества Т-клеток CD3⁺CD4⁺CD196⁺ субпопуляции (r=0,320). Выявлена заметная обратная зависимость уровня IL-17F и содержания Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD196⁺ субпопуляции (r=-0,555).

У детей с аллергическими заболеваниями органов дыхания выявлены значимые взаимосвязи

сывороточного содержания цитокинов и субпопуляций Т-лимфоцитов. Определены прямые корреляции умеренной силы IL-17A (r=0,328), обратные слабой силы IL-8 (r=-0,219) и IFN-γ (r=-0,256) и количества клеток CD3⁺CD4⁺CD196⁺ субпопуляции Th в периферической крови. Отмечены взаимосвязи уровня сывороточного содержания IL-17A с количеством CD3⁺CD8⁺ Т-клеток (r=-0,14) и IL-4, IL-8, IFN-γ с CD3⁺CD4⁺ (r=0,155; r=0,149; r=-0,111 соответственно).

Обсуждение

Проведенная оценка цитокинового профиля сыворотки крови и субпопуляций Т-лимфоцитов при аллергических заболеваниях органов дыхания выявила сопоставимое с показателями здоровых детей количество CD3⁺CD4⁺ позитивных Т-клеток, дисбаланс в субпопуляционном составе Т-хелперов за счет преобладания Th2 и Th17, активацию синтеза IL-17A, IL-4, IL-8, IL-13, низкий уровень IFN-γ, изменения силы и направленности взаимосвязей цитокинового профиля и спектра Т-субпопуляций.

В последние годы расширение спектра изучаемых клонов Т-хелперов определило сложные иммунные механизмы реализации аллергического воспаления, обусловленные изменениями соотношения активации Th с доминированием Th2 и/или Th17 и неадекватным ответом Th1 и Treg [1, 2, 4, 5, 17]. Снижение числа CD3⁺CD4⁺ клеток, синтезирующих IFN- γ , и продукции IFN- γ отмечены у пациентов при развитии бронхиальной астмы и аллергического ринита. Участие Th17 при БА реализуется через синтез цитокинов семейства IL-17, активирующих различные типы лейкоцитов и их хемотаксис в ткань легкого. IL-17A и IL-17F могут стимулировать продукцию слизи, гиперплазию эпителия бронхов, гиперчувствительность и ремоделирование дыхательных путей [1, 4, 25]. При бронхиальной астме и аллергическом рините функционирование цитокиновой системы генетически детерминировано и зависит от стимулирующих воздействий, экспрессия генов цитокинов или их активация осуществляются под влиянием ряда внешних факторов, включая антигены/аллергены и антигены собственных измененных клеток и тканей [1, 2, 12, 17, 25, 26].

Интерлейкин-4 обладает способностью усиливать пролиферацию В-лимфоцитов, моноцитов и функциональную активность субпопуляций Т-хелперов в направлении Th2, подавлять активацию Th1 и синтез TNF- α , IFN- γ и считается одним из главных регуляторов развития аллергического воспаления в тканях, при схожей биологической активности IL-13 не способен влиять на Т-субпопуляции. При бронхиальной астме IL-13 вызывает гиперреактивность бронхов, гиперплазию бокаловидных клеток эпителия дыхательных путей и стимулирует повышенную секрецию слизи [4–6, 9].

У детей с изолированным течением бронхиальной астмы и в сочетании с аллергическим ринитом по сравнению со здоровыми сверстниками не выявлено различий обеспеченности Т-лимфоцитами и Т-цитотоксическими клетками, отмечены различия в структуре и количестве субпопуляций Т-клеток памяти. Удельный вес субпопуляции CD4⁺CD45RO⁺ клеток был значимо ниже при реализации аллергического заболевания, что может быть обусловлено выходом популяции в очаг воспаления и согласуется с данными Liu и соавт. (2001), зафиксировавшими снижение экспрессии рецептора CD45RO на Т-клетках мокроты у пациентов с бронхиальной астмой при применении глюкокортикоидных препаратов [26]. CD8CD45RO позитивные Т-клетки способны секретировать цитокины Th2-профиля, включая IL-4, IL-5 и IL-13. Созревающие Т-клетки меняют набор хемокиновых рецепторов и молекул адгезии в зависимости от внеклеточных сигналов, что отражает проявление специфических эффекторных функций. Экспрессия CCR6 определяет регуляцию рекрутирования эффекторных Т-клеток в

ткани [27], Th17 оказывают опосредованное IL-17A воздействие на продукцию муцина и гиперплазию бокаловидных клеток, IL-17F совместно с IL-17A вызывает продукцию хемокинов, влияет на транскрипцию мРНК и трансляцию белка [17, 24, 25, 27].

Заключение

У детей при изолированном течении бронхиальной астмы и в сочетании с аллергическим ринитом выявлены: сопоставимое с показателями здоровых детей количество CD3⁺CD4⁺ позитивных Т-клеток, дисбаланс в субпопуляционном составе Т-хелперов за счет преобладания Th2 и Th17, активация синтеза IL-17A, IL-4, IL-8, IL-13, низкий уровень сывороточного IFN- γ , изменения силы и направленности взаимосвязей цитокинового профиля и спектра Т-субпопуляций.

Информация об источниках финансирования

Финансовой поддержки в настоящей статье не было.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов

- Концепция и дизайн исследования – Е.В. Просекова.
- Сбор и обработка материала – А.И. Турянская, Н.Г. Плехова, М.С. Долгополов.
- Статистическая обработка данных – А.И. Турянская, В.А. Сабыныч.
- Написание текста – Е.В. Просекова, В.А. Сабыныч.
- Редактирование – Е.В. Просекова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Global strategy for asthma management and prevention. Global Initiative for Asthma. (GINA) 2018. Available from: www.ginasthma.org.
2. Brożek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140:950-958. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.03.050.
3. Agache I, Akdis CA, Chivato T, Hellings P, Hoffman-Sommergruber K, Jutel M et al. EAACI White Paper on Research, Innovation and Quality Care Published by the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. Zurich. Switzerland. 2018:152.
4. Kubo M. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev*. 2017;278:162-172.
5. Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Annunziato F. Role of Type 2 Innate Lymphoid Cells in Allergic Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17:66. DOI: 10.1007/s11882-017-0735-9.
6. Varricchi G, Harker J, Borriello F, Marone G, Durham SR, Shamji MH. T follicular helper (Tfh) cells in normal immune responses and in allergic disorders. *Allergy* 2016;71:1086-1094. DOI: 10.1111/all.12878.
7. Козлов ВА. Иммунная парадигма и иммуносупрессорная доминанта в патогенезе основных заболеваний современности

- менного человека. Бюллетень сибирской медицины. 2019;18(1):7-17 [Kozlov VA. Immune paradigm and immunosuppressive dominance in the pathogenesis of major diseases of modern man. Bulletin of Siberian Medicine. 2019;18(1):7-17 (In Russ.)].
8. Eberle G. Immunity by equilibrium. Nature Reviews. Immunology. 2016;16:524-532.
 9. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nature Immunology. 2015;16 (1):45-56. DOI: 10.1038/ni.3049.
 10. Курбачёва ОМ, Жестков АВ, Нагаткин ДА, Кулагина ВВ, Нагаткина ОВ. Современный взгляд на иммунопатогенез бронхиальной астмы. Российский Аллергологический Журнал. 2016;2:10-14 [Kurbacheva OM, Zhestkov AV, Nagatkin DA, Kulagina VV, Nagatkina OV Modern view on the immunopathogenesis of bronchial asthma. Russian Allergy Journal. 2016;2:10-14 (In Russ.)].
 11. Muehling LM, Lawrence MG, Woodfolk JA. Pathogenic CD4⁺ T-cells in patients with asthma. J Allergy Clin Immunol. 2017;140(6):1523-1540. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.02.025.
 12. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor – β are essential for the differentiation of interleukin-17 – producing human T-helper cells. Nature immunol. 2007;8(9):942-949.
 13. Willem van de V, Mübecel A. Mechanisms of immune regulation in allergy. Global Atlas of allergy. 2014;90-91. DOI: 10.1111/imr.12555.
 14. Кудрявцев ИВ, Борисов АГ, Волков АЕ, Савченко АА, Серебрякова МК, Полевщиков АВ. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки. Тихоок. мед. журн. 2015;2:30-35 [Kudryavtsev IV, Borisov AG, Volkov AE, Savchenko AA, Serebryakova MK, Polevshchikov AV. Analysis of the expression level of CD56 and CD57 by cytotoxic T-lymphocytes of different levels of differentiation. Pacific Medical Journal. 2015;2:30-35 (In Russ.)].
 15. Lund FE, Randall TD. Effector and regulatory B-cells: modulators of CD4⁺ T-cell immunity. Nat Rev Immunol. 2010;10:236-247. DOI: 10.1038/nri2729.
 16. Akdis M. Healthy immune response to allergens: T-regulatory cells and more. Curr Opin Immunol. 2006;18:738-744.
 17. Симбирцев АС. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека. СПб.: Фолиант. 2018:512 [Simbircev AS. Cytokines in the pathogenesis and therapy of human diseases. St. Petersburg: Foliant Publ. 2018:512 (In Russ.)].
 18. Eusebio M, Kuna P, Kraszula L, Kurczyk M, Pietruczuk M. Allergy-related changes in levels of CD8⁺CD25⁺Foxp3 (bright) Treg cells and Foxp3 mRNA expression in peripheral blood: the role of IL-10 or TGF- β . J Biol Regul Homeost Agents. 2014;28(3):461-470.
 19. Agache I, Akdis CA. Endotypes of allergic diseases and asthma: An important step in building blocks for the future of precision medicine. Allergol Int. 2016;65:243-252. DOI: 10.1016/j.alit.2016.04.011.
 20. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». Москва: Оригинал-макет. 2017:160 [National program «Bronchial asthma in children. Treatment and Prevention Strategy». Moscow: Original model. 2017:160 (In Russ.)].
 21. Bousquet J, Pfaar O, Togias A, Schünemann HJ, Ansotegui I, Papadopoulos NG et al. 2019 Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). Care pathways for allergen immunotherapy. Allergy. 2019. DOI: 10.1111/all.13805.
 22. Хайдуков СВ, Байдун ЛА, Зурочка АВ, Тотолян АА. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов». Российский иммунологический журнал. 2014;8(4):974-992 [Khaydukov SV, Baydun LA, Zurochka AV, Totolyan AA. The standardized technique «Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry». Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal. 2014;8(4):974-992 (In Russ.)].
 23. Bossowski A, Moniuszko M, Idźkowska E, Dąbrowska M, Jeznach M, Sawicka B et al. Evaluation of CD4⁺CD161⁺CD196⁺ and CD4⁺IL-17⁺ Th17 cells in the peripheral blood of young patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. Pediatr Endocrinol Diabetes Metab. 2012;18(3):89-95.
 24. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin Lab Med. 2007;27(3):469-485.
 25. Zhao Y, Yang J, Gao Y. Altered expressions of helper T-cell (Th)1, Th2, and Th17 cytokines in CD8⁺ and $\gamma\delta$ T-cells in patients with allergic asthma. J Asthma. 2011;48:429-436. DOI: 10.3109/02770903.2011.570403.
 26. Liu MC, Proud D, Lichtenstein LM, Hubbard WC, Bochner BS, Stealey BA et al. Effects of prednisone on the cellular responses and release of cytokines and mediators after segmental allergen challenge of asthmatic subjects. J Allergy Clin Immunol. 2001;108:29-38.
 27. Francis JN, Sabroe I, Lloyd CM, Durham SR, Till SJ. Elevated CCR6⁺CD4⁺ T-lymphocytes in tissue compared with blood and induction of CCL20 during the asthmatic late response. Clin Exp Immunol. 2008;152(3):440-447. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2008.03657.x.

Статья поступила 17.07.2019 г., принята к печати 11.09.2019 г.
Рекомендована к публикации А.Н. Пампурой

Информационная страница

Просекова Елена Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Владивосток.

Турянская Алина Ивановна, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, г. Владивосток.

Плехова Наталья Геннадьевна, доктор биологических наук, профессор кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, руководитель ЦНИЛ ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, г. Владивосток.

Долгополов Максим Сергеевич, ассистент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии, ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, г. Владивосток.

Сабыныч Виталий Александрович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России, г. Владивосток.

Дополнительные утверждения

Авторы согласны на публикацию представленной работы.

Авторы подтверждают, что данная рукопись в настоящее время не представлена для публикации в другие издания и не была принята для публикации в других изданиях.

ASSESSMENT OF CYTOKINE PROFILE AND T-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN BLOOD SERUM IN CHILDREN WITH ALLERGIC DISEASES OF THE RESPIRATORY SYSTEM

Prosekova E.V., Turyanskaya A.I., Plekhova N.G., Dolgoplov M.S., Sabynych V.A.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pacific State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation; 2, pr-kt Ostryakova, Vladivostok, 690002, Russian Federation

Key words: subpopulations of T-lymphocytes, cytokine profile, bronchial asthma, allergic rhinitis, children

Summary. Expansion of the range of examined T-helper clones has determined more complex immune mechanisms for the implementation of allergic inflammation.

Objective. To characterize the parameters and relationships between the serum cytokine profile and T-lymphocyte subpopulation in peripheral blood of children with bronchial asthma and allergic rhinitis.

Materials and methods. 150 children aged between 3–11 years old with bronchial asthma, and allergic rhinitis and 30 healthy volunteers were examined. Immunological parameters were assessed by flow cytometry, the concentration of serum interleukins and IgE were determined by means of enzymelinked immunosorbent assay. Statistical analysis was performed with «Statistica 10» program with a critical level of significance $p < 0.05$.

Results. High levels of interleukins -4, -8, -13, 17A were determined, IL-7F level was not significantly different from that in control group and low level of IFN- γ was found in the serum of children with allergic diseases. The number of CD3⁺CD8⁺CD45RO⁺, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ T-lymphocytes, CD3⁺CD4⁺ T-helper cells and Th17 were increased and at the same time CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ memory cells were decreased in bronchial asthma and allergic rhinitis children. Number of Th17 cells in healthy children was $9.49 \pm 1.6\%$, in allergic children it was significantly higher – $14.5 \pm 0.77\%$ ($p < 0.001$). Analyses of serum cytokine count in children with isolated BA and in association with allergic rhinitis revealed multidirectional correlations differing in strength and direction from those in the group of healthy children.

Conclusion. In children with isolated bronchial asthma and associated with allergic rhinitis the following parameters were found: CD3⁺CD4⁺ T-cells count was comparable to that in healthy children, the imbalance of T-helper subpopulation: prevalence of Th2 and Th17, activation of IL-17A, IL-4, IL-8, IL-13 synthesis and low level of serum IFN- γ .