

ХАРАКТЕР ИЗМЕНЕНИЙ ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ БРОНХОЛЕГОЧНЫМ АСПЕРГИЛЛЕЗОМ

Фролова Е.В.¹, Козлова Я.И.², Учеваткина А.В.², Филиппова Л.В.¹, Аак О.В.¹, Соболев А.В.², Клишко Н.Н.²

¹ НИИ Медицинской микологии им. П.Н. Кашкина,

² Кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

THE CHARACTER OF THE IMMUNE RESPONSE CHANGES IN PATIENTS WITH ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS

Frolova E.V.¹, Kozlova Y.I.², Uchevatkina A.E.¹, Filippova L.V.¹, Aak O.V.¹, Sobolev A.V.², Klimko N.N.²

¹ Kashkin Research Institute of Medical Mycology,

² Department of clinical mycology, allergy and immunology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg

Проведен сравнительный анализ иммунологических показателей у больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА) и бронхиальной астмой (БА). Выявлены сходные изменения иммунологических параметров у больных АБЛА и БА: снижение абсолютного и относительного количества НК-клеток, продукции интерферонов (ИФН- α и ИФН- γ), повышение числа НКТ-клеток. Особенностью иммунного реагирования больных АБЛА явилась повышенная продукция ИЛ-10 на фоне угнетения выработки ИФН- γ в ответ на стимуляцию клеток крови аллергеном *A. fumigatus*. Таким образом, соотношение уровней исследованных цитокинов может служить прогностическим биомаркером течения заболевания и использоваться при мониторинге терапии АБЛА.

АБЛА – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus* spp., которое осложняет течение БА и муковисцидоза [1]. По оценкам экспертов, количество больных АБЛА в мире составляет около четырех миллионов человек, а в Российской Федерации порядка ста семидесяти пяти тысяч [2,3]. Считают, что сенсибилизация к *Aspergillus* spp. у пациентов с БА играет существенную роль в поддержании хронического аллергического воспаления при АБЛА [4]. Однако количество публикаций по этой теме ограничено, а иммунопатогенез АБЛА

изучен недостаточно.

Цель исследования – изучение характера изменений иммунного ответа у больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом.

Материалы и методы. В проспективное исследование включили две группы больных. Первую группу составили 11 больных АБЛА (Me – 38 лет), вторую группу – 15 больных тяжелой БА (Me – 45 лет). Для выявления микогенной сенсибилизации проводили кожное тестирование с грибковыми аллергенами *Aspergillus* («Allergopharma», Германия, разрешение этического комитета СЗГМУ им. И.И. Мечникова от 24.06.2014), в сыворотке крови методом ИФА определяли уровень общего иммуноглобулина E (IgE) (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия). Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев R. Agarwal et al., 2013 г. [5]. Контрольную группу составили 18 условно здоровых людей (Me – 37,5 лет). Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили с использованием проточного цитометра «FC-500» (Beckman Coulter, США). Лимфоциты окрашивали моноклональными антителами, меченными флуорохромами: CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD, CD3-PC5, CD19-ECD и CD56-RD1 (Beckman Coulter, США). Для исследования спонтанной продукции интерферона ИФН- γ и ИФН- α использовали гепаринизированную кровь, разве-

денную в 5 раз полной питательной средой: среда RPMI 1640 с добавлением L-глутамина («Биолот», Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Биолот», Россия). Для оценки индуцированной продукции интерферонов к клеткам крови добавляли ФГА («Sigma», США) в конечной дозе 50 мкг/мл или вирус болезни Ньюкасла (цитолитический титр 1/256, ФГУ НИИ гриппа, Россия). Время инкубации составило 24 часа. С целью изучения антиген-специфической продукции ИФН- γ и интерлейкинов (ИЛ-4 и ИЛ-10) к 100 мкл разведенной крови добавляли 100 мкл аллергена *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия) в конечной концентрации 10 мкг/мл. В предварительных экспериментах были определены оптимальная доза аллергена и сроки культивирования клеток. Через 144 часа (6 суток) инкубации клеток надосадочную жидкость аликвотировали и замораживали при -20°C до проведения анализа. Цитокины в надосадочной жидкости определяли в коммерческих ИФА тест-системах («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Полученные данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10. Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными различиями сравниваемых параметров считали значения $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Микогенная сенсибилизация – важный этап в патогенезе АБЛА, поэтому положительная кожная проба и/или выявление sIgE к *Aspergillus* spp. в сыворотке крови $> 0,35$ МЕ/мл служат обязательными диагностическими критериями [1,5]. В группе АБЛА в отличие от больных БА у всех больных установлена положительная кожная проба с аллергеном *A. fumigatus* и достоверно выше уровни общего IgE (963 (954 \div 1691) vs 68 (10,0 \div 600,0) МЕ/мл, $p=0,0002$) и sIgE к *Aspergillus* spp. (4,59 (0,48 \div 13,1) vs 0,02 (0,01 \div 0,02) МЕ/мл; $p=0,0006$).

Имунофенотипирование лимфоцитов у больных АБЛА и БА не выявило различий в относительном и абсолютном числе как Т-лимфоцитов в целом (CD3+CD19-), так и основных их субпопуляций (CD3+CD4+, CD3+CD8+) по сравнению с условно здоровыми лицами. Не установ-

лено изменений в экспрессии маркера ранней активации на Т-хелперах (CD3+CD4+CD25+) в обеих группах обследованных больных. Особенностью больных БА по сравнению с контрольной группой было снижение абсолютного и относительного количества NK-клеток (CD3-56+) и повышение числа NKT-клеток (CD3+56+). В группе больных АБЛА снижение числа NK-клеток установлено в 72% случаев, а повышение количества NKT-клеток у 56% больных. Однако из-за большого разброса данных статистически значимых различий с условно здоровыми лицами не было выявлено. Известно, что NK-клетки являются ранними продуцентами ИФН- α и ИФН- γ , участвующими в поляризации иммунного ответа по Т-хелперному 1 типу (Th1) [6,7]. В нашем исследовании установлено ослабление способности клеток крови к продукции ИФН- α в обеих группах больных, достоверное снижение секреции ИФН- γ у больных АБЛА и тенденция к снижению митоген-индуцированной продукции данного цитокина у больных БА. NKT-клетки рассматривают как неклассическую субпопуляцию Т-лимфоцитов. Уровень тех или иных цитокинов, продуцируемых NKT-клетками, может изменяться в зависимости от вида презентируемого антигена [4]. Считают, что при развитии аллергического воспалительного процесса NKT-клетки поддерживают активацию Th2, которые играют важную роль в патогенезе аллергических заболеваний.

На следующем этапе исследования провели сравнительный анализ уровней патогенетически значимых цитокинов, продуцируемых клетками цельной крови в ответ на инкубацию с аллергеном *A. fumigatus*. Нами, как и другими исследователями, не установлена способность аллергенов *A. fumigatus* стимулировать клетки крови к продукции ИЛ-4 [7]. Предполагают, что это связано с тем, что ИЛ-4 в большей степени участвует в инициации иммунного ответа по Th2 типу, в то время как ИЛ-13 и ИЛ-5 поддерживают дальнейшую поляризацию иммунного ответа [1]. В нашем исследовании поляризация специфического иммунного ответа оценивалась по способности клеток к продукции ИФН- γ и ИЛ-10. Вычисляли индекс соотношения (ИС) индуцированной выработки ИФН- γ /ИЛ-10. В контрольной группе грибковый аллерген активно стимулировал

лимфоциты к продукции ИФН- γ и в меньшей степени к выработке ИЛ-10. ИС ИФН- γ /ИЛ-10 был равен 5,6. Полученные нами данные совпадают с результатами других авторов, которые установили, что у здоровых людей чаще выявляют *Aspergillus*-специфичные клоны Т-лимфоцитов, вырабатывающие ИФН- γ и редко секретирующие ИЛ-4, ИЛ-17 и ИЛ-10 [8]. Не установлено достоверных отличий между спонтанной и индуцированной грибковым аллергеном продукцией ИФН- γ и ИЛ-10 у больных БА. Полученные данные могут свидетельствовать о выраженной активации клонов Т-лимфоцитов, специфичных к другим аэроаллергенам, но не к микромицетам. Это подтверждается отсутствием у больных БА sIgE к *A. fumigatus*. У больных АБЛА антиген-специфическая стимуляция выявила высокую продукцию клетками периферической крови ИЛ-10 (72,2 (44,8÷108,2) vs 17,0 (8,0÷45,0) пг/мл; $p=0,015$) и тенденцию к снижению выработки ИФН- γ (27,0 (16,4÷59,0) vs 55,0 (40,0÷55,0) пг/мл, $p=0,06$) по сравнению с показателями условно здоровых людей, что отразилось в снижении ИС – 2,0.

Данные цитокинового профиля больных АБЛА свидетельствуют об усилении активности специфических к *A. fumigatus* регуляторных Т-лимфоцитов, что характерно для включения механизмов ограничения воспалительного процесса. Однако, высокие урони sIgE к *A. fumigatus* указывают, что противовоспалительный цитокин ИЛ-10 преимущественно подавляет продукцию ИФН- γ и это способствует преобладанию Th2-типа иммунного ответа у больных АБЛА. Полученные данные согласуются с мнением, что именно сенсibilизация к *Aspergillus* spp. играет важную роль в иммунопатологических механизмах, лежащих в основе патогенеза АБЛА.

Заключение. Выявлены сходные изменения иммунологических параметров у больных АБЛА и БА: снижение абсолютного и относительно количества НК-клеток, продукции ИФН- α и ИФН- γ , повышение числа НКТ-клеток. Особенностью иммунного реагирования больных АБЛА явилась повышенная продукция ИЛ-10 на фоне угнетения выработки ИФН- γ в ответ на стимуляцию клеток крови аллергеном *A. fumigatus*. Таким образом, соотношение уровней цитокинов может

служить прогностическими биомаркерами течения заболевания и быть использованным при мониторинге терапии АБЛА.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Agarwal R. Severe asthma with fungal sensitization // *J. Fungi*. – 2016. – Vol.2. – P.13-18.
2. Moss R.B. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and *Aspergillus* infection in cystic fibrosis // *Curr Opin Pulm Med*. – 2010. – Vol.16. – P.598-603.
3. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Хостелиди С.Н. и др. Распространенность тяжелых и хронических микотических заболеваний в Российской Федерации по модели LIFE program // *Проблемы медицинской микологии*. – 2014. – № 1. – С.3-9.
4. Margalit A., Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2015. – Vol. 39. – P.670-687.
5. Agarwal R.A., Chakrabarti A., Shah D. et al. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2013. – Vol. 43. – P. 850-873.
6. Williams C. M., Hubeau S., Mearns H. Cytokine Pathways in Allergic Disease // *Toxicologic Pathology*. – 2012. – Vol.40. – P.205-215.
7. Becker K.L., Gresnigt M S., Smeekens S.P. et al. Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in allergic bronchopulmonary aspergillosis patients // *Clinical & Experimental Allergy*. – 2014. – Vol.45. – P.423-437.
8. Jolink H., Meijssen I.C., Hagedoorn R.S. et al. Characterization of the Tcell mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and catalase 1 in healthy individuals // *J Infect Dis*. – 2013. – Vol. 208. – P. 847-856.