

ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ТРУДНО ПОДДАЮЩЕЙСЯ ЛЕЧЕНИЮ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Антонович Ж.В.¹, Гончарова Н.В.²

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет»,

кафедра кардиологии и внутренних болезней,

²ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии

и медицинских биотехнологий»,

г. Минск, Республика Беларусь

Антонович Жанна Владимировна

Доцент, кандидат медицинских наук, доцент кафедры кардиологии и внутренних болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Заместитель заведующего кафедрой по инновационной деятельности, член Белорусского респираторного общества, член Белорусского общества терапевтов.

Научные интересы: терапия, пульмонология, клиническая аллергология и иммунология.



Тема диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук и год защиты: «Значение иммунологических показателей в определении особенностей клинического течения бронхиальной астмы (контролируемое, частично контролируемое, неконтролируемое; обострение, ремиссия)», 2010 г.

Бронхиальная астма (БА) представляет собой гетерогенное заболевание, характеризующееся наличием хронического воспаления дыхательных путей, в котором ведущую роль играет система Т-клеточного иммунитета [1, 2]. Несмотря на то, что у большинства пациентов может быть достигнут хороший контроль БА, у некоторых из них хороший контроль астмы не достигается даже при оптимальной терапии [1, 4, 6]. Термин «трудно поддающаяся лечению» БА применяется в том случае, когда пациент не достигает приемлемого уровня контроля над астмой при лечении в режиме ступени 4 (принимает препарат неотложной помощи плюс 2 и более препаратов для контроля течения заболевания, включая ингаляционный глюкокортикоид (ИГКС) в высокой дозе) [2, 6]. Назначение пероральных глюкокортикоидов (ступень 5) приводит к многочисленным осложнениям и не всегда сопровождается достижением необходимого эффекта [2, 4]. Так, по данным исследования GOAL (The Gaining Optimal Asthma Control) добавление пероральных глюкокортикоидов к лечению β_2 -агонистами длительного действия и ИГКС в максимально рекомендованных дозах позволило добиться адекватного контроля лишь у небольшого процента пациентов [4]. При трудно поддающейся лечению БА целесообразно проведение дополнительных диагностических мероприятий [1, 2].

Целью нашего исследования было выявить особенности клеточного иммунитета у пациентов с трудно поддающейся лечению БА.

Материалы и методы

В исследование включены 52 пациента с БА в межприступном периоде заболевания (период ремиссии). Средний возраст пациентов с БА составил 42 года (от 28 до 56 лет), группа включала 23% (12) мужчин и 77% (40) женщин. Средняя длительность

БА была 8 лет (от 3 до 13,5 лет). Аллергическую форму БА имели 12% (6) пациентов, неаллергическую – 15% (8), смешанную – 73% (38) пациентов. У 36% (19) пациентов наблюдалась неконтролируемая БА, у 33% (17) – частично контролируемая БА, у 31% (16) – контролируемая БА. В группе пациентов с неконтролируемой БА у 8 пациентов астма была определена как трудно поддающаяся лечению. Эти пациенты составляли 15% от всех пациентов с БА и 42% в группе с неконтролируемой БА. Все пациенты с трудно поддающейся лечению БА принимали базисную терапию, соответствующую ступени 4 (ИГКС в высокой дозе (флутиказон 1000 мкг в сутки) в комбинации с β_2 -агонистом длительного действия (сальметерол 100 мкг в сутки) и β_2 -агонист короткого действия для неотложной помощи).

В группу контроля вошли 30 практически здоровых лиц. Средний возраст лиц контрольной группы составил 42 года (от 30 до 54 лет), их них 37% (11) мужчин и 63% (19) женщин. Статистически значимых различий по возрасту и полу между группами пациентов с БА и контрольной группой не было ($p > 0,05$).

Клиническое обследование включало сбор анамнеза и объективный осмотр пациента. Диагноз аллергической, неаллергической и смешанной форм БА устанавливался нами в соответствии с МКБ-10. При определении формы заболевания использовались данные анамнеза и предшествующего аллергологического обследования, включавшего определение аллергенспецифических IgE в крови и/или кожные тесты.

Уровень контроля БА оценивали по критериям GINA [1].

Определение Т-лимфоцитов ($CD3^+$), Т-лимфоцитов-хелперов ($CD4^+$), цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD8^+$), естественных киллерных клеток ($CD3^+CD8^+$), естественных киллерных клеток ($CD16^+$), естественных киллерных клеток с фенотипом Т-лимфоцитов ($CD3^+CD16^+$), активированных клеток ($CD25^+$), естественных регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{hi}$) проводилось на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США) с моноклональными антителами (Beckman Coulter, США). Естественные регуляторные Т-клетки определялись как фракция $CD4^+CD25^{hi}$ -лимфоцитов с высоким уровнем экспрессии $CD25$ ($CD4^+CD25^{hi}$ -клетки). Популяции и субпопуляции лимфоцитов оценивались в гейте лимфоцитов. На пробу анализировалось не менее 30 000 клеток. Учет и анализ данных производился в автоматическом режиме с использованием программы CELLQuest. Иммунорегуляторный индекс (ИРИ) определялся по соотношению Т-хелперов/цитотоксических Т-лимфоцитов ($CD4^+/CD8^+$). Абсолютное количество лимфоцитов, несущих соответствующие маркеры, в 1 мкл крови, рассчитывалось относительно абсолютного числа всех лимфоцитов, принимаемого за 100%. Абсолютное количество естественных регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{hi}$), в 1 мкл крови, рассчитывалось относительно абсолютного числа $CD4^+$ -лимфоцитов, принимаемого за 100%.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета прикладных программ Statistica 8,0 (StatSoft, Inc., США). Применялись критерии Шапиро-Уилка, Левена, Стьюдента, Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, χ^2 Пирсона, двусторонний точный критерий Фишера, параметрический однофакторный дисперсионный анализ с тестом Шеффе. Для преодоления проблемы множественных сравнений использовалась поправка Бонферрони. Значения показателей приводятся в виде среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm s$) для значений признаков, подчиняющихся нормальному распределению, и медиана (Me) и интерквартильный размах (25-й и 75-й процентиля) для не подчиняющихся нормальному распределению значений. За критический уровень статистической значимости принимали вероятность безошибочного прогноза равную 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Характеристика групп пациентов с контролируемой БА (полный и частичный контроль), неконтролируемой БА и трудно поддающейся лечению БА представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика групп пациентов с контролируемой (полный и частичный контроль), неконтролируемой и трудно поддающейся лечению бронхиальной астмой

Параметр	Группа		
	Пациенты с контролируемой БА (полный и частичный контроль) (n=33)	Пациенты с неконтролируемой БА (n=11)	Пациенты с трудно поддающейся лечению БА (n=8)
Средний возраст, годы M±s	44±13	39±16	39±16
Половой состав, % (абс.)			
Мужчины	27 (9)	18 (2)	13 (1)
Женщины	73 (24)	82 (9)	87 (7)
Форма БА, % (абс.)			
Аллергическая	12 (4)	18 (2)	0
Неаллергическая	24 (8)	0	0
Смешанная	64 (21)	82 (9)	100 (8)
Длительность БА, годы, Me (25%-75%)	6 (2-11)	11 (4-15)	14 (4-19,5)
Курение (активное и пассивное), % (абс.)	39 (13)	45 (5)	13 (1)
Доля пациентов, принимающих базисную терапию, % (абс.)	85 (28)	72 (8)	100 (8)
Сопутствующие заболевания, % (абс.)			
Хронический риносинусит	15 (5)	9 (1)	25 (2)
Артериальная гипертензия	33 (11)	27 (3)	25 (2)
ИБС	6 (2)	-	-
Сахарный диабет типа 2	6 (2)	-	-
Ожирение	27 (9)	27 (3)	12 (1)

Примечания:

1. БА – бронхиальная астма.
2. $p > 0,05$ во всех сравнениях.

Мы провели сравнительный анализ показателей клеточного иммунитета в группах пациентов с контролируемой БА (полный и частичный контроль), неконтролируемой БА и трудно поддающейся лечению БА. Статистически значимые различия были получены по процентному содержанию естественных регуляторных Т-клеток ($CD4^+C-D25^{hi}$) ($p=0,005$) и естественных киллерных клеток ($CD16^+$) ($p=0,013$) (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели клеточного иммунитета в группах пациентов с контролируемой (полный и частичный контроль), неконтролируемой и трудно поддающейся лечению бронхиальной астмой, $M \pm s$ или Me (25%-75%)

Показатель	Группа		
	Пациенты с контролируемой БА (полный и частичный контроль) (n=33)	Пациенты с неконтролируемой БА (n=11)	Пациенты с трудно поддающейся лечению БА (n=8)
Т-лимфоциты CD3 ⁺ , %	68,08 (66,57-70,67)	67,56 (64,52-68,34)	70,02 (66,45-77,09)
Т-лимфоциты CD3 ⁺ , кл/мкл	1363,75 (1145,17-1715,78)	1358,85 (1034,92-1893,03)	1969,35 (1188,29-2157,95)
Т-хелперы CD4 ⁺ , %	38,64 (35,33-41,59)	38,98 (33,98-39,76)	40,73 (39,03-43,27)
Т-хелперы CD4 ⁺ , кл/мкл	866,56±337,82	880,00±302,47	936,55±336,03
Т-цитотоксические CD8 ⁺ , %	23,95 (21,03-25,13)	23,48 (20,39-25,09)	23,26 (22,47-29,97)
Т-цитотоксические CD8 ⁺ , кл/мкл	486,47 (393,64-609,76)	472,82 (309,89-669,68)	649,25 (412,43-779,87)
Естественные киллеры CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	11,78 (10,38-14,34)	11,51 (10,89-20,20)	9,74 (8,44-12,79)
Естественные киллеры CD3 ⁺ CD8 ⁺ , кл/мкл	234,48 (197,32-310,30)	285,32 (164,17-491,15)	252,56 (129,75-358,23)
Естественные киллеры CD16 ⁺ , %	14,56 (12,87-17,62)	15,35 (13,05-19,72)	10,57* (8,76-13,06)
Естественные киллеры CD16 ⁺ , кл/мкл	316,84 (231,77-362,89)	389,21 (216,51-564,54)	228,56 (156,76-321,03)
Т-клетки с киллерной активностью CD3 ⁺ CD16 ⁺ , %	7,66 (4,87-9,89)	8,14 (7,08-10,78)	8,02 (5,67-18,71)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ , кл/мкл	148,45 (87,72-360,69)	198,38 (81,56-323,22)	210,65 (101,87-386,94)
Активированные клетки CD25 ⁺ , %	5,22 (4,17-7,78)	7,01 (5,92-11,82)	5,63 (4,09-7,09)
CD25 ⁺ , кл/мкл	124,14 (88,59-154,34)	165,40 (125,82-226,94)	109,51 (87,22-166,90)
Естественные регуляторные Т-клетки CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , %	6,52±1,37	5,43±0,92	5,09±1,15**
CD4 ⁺ CD25 ^{hi} , кл/мкл	49,07 (40,34-66,37)	50,69 (29,90-64,76)	51,49 (31,90-60,13)
ИРИ	1,68 (1,57-1,80)	1,64 (1,56-2,09)	1,69 (1,43-1,85)

Примечания:

1. БА – бронхиальная астма, ИРИ – иммунорегуляторный индекс;
2. * – $p < 0,05$ по сравнению с показателем в группе пациентов с контролируемой БА и $p < 0,01$ по сравнению с показателем в группе пациентов с неконтролируемой БА;
3. ** – $p < 0,05$ по сравнению с показателем в группе пациентов с контролируемой БА.

Таким образом, установлено, что для трудно поддающейся лечению БА характерно снижение содержания естественных регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{hi}$) на 22% по сравнению с контролируемой БА ($p<0,05$) и на 32% по сравнению с группой контроля ($5,09\pm 1,15\%$ и $7,44\pm 2,13\%$, соответственно, $p<0,01$) (таблица 2, рисунок 1).

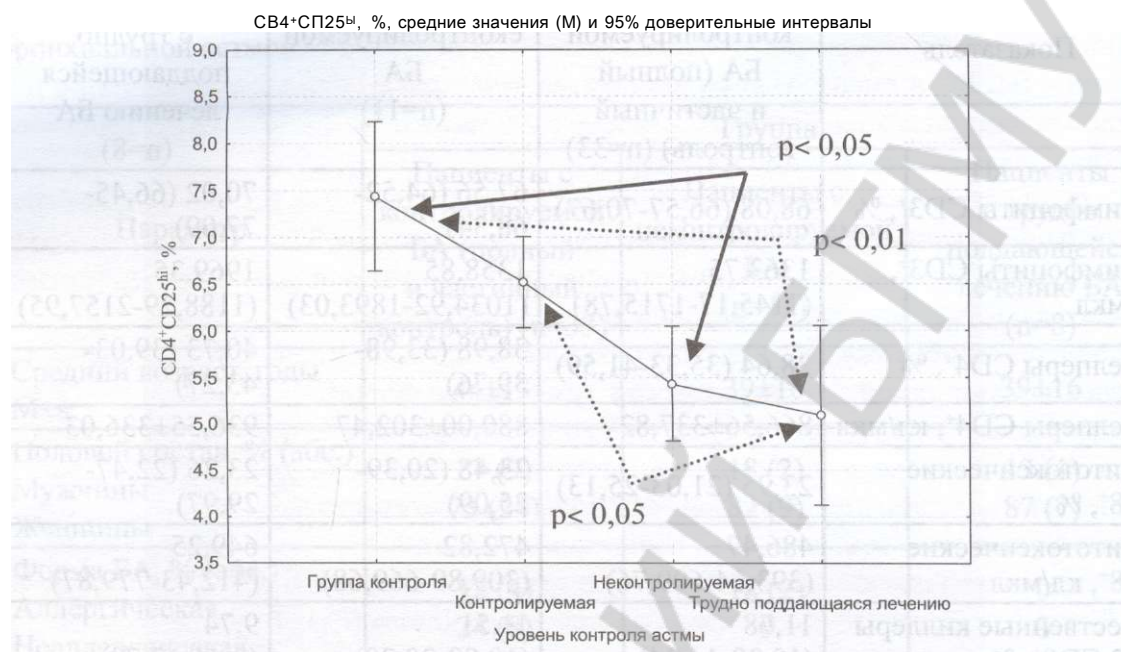


Рисунок 1 - Содержание естественных регуляторных Т-клеток ($CD4^+CD25^{hi}$) у пациентов с разными уровнями контроля астмы и практически здоровых лиц, %

Также при трудно поддающейся лечению БА выявлено снижение содержания естественных киллерных клеток с фенотипом $CD16^+$ на 27% по сравнению с контролируемой БА ($p<0,05$), на 31% по сравнению с неконтролируемой БА ($p<0,01$) (таблица 2) и на 25% по сравнению с группой контроля ($10,57$ ($8,76-13,06$)% и $14,08$ ($11,35-16,93$)%, соответственно, $p=0,043$).

При аллергии и БА наблюдается дисбаланс Th1/Th2 с преобладанием Th2-клеток и синтезируемых ими цитокинов интерлейкина (IL)-4, IL-5, IL-9, IL-13 и др., которые подавляют пролиферацию Th1-клеток и их функции, в т.ч. секрецию IFN- γ и IL-2 [2, 5, 8]. Th2-лимфоцитам и IL-4 принадлежит ключевая роль в синтезе IgE, тогда как IFN- γ , активируя клеточное звено иммунитета, способен тормозить гиперпродукцию IgE, что играет важную роль в регуляции аллергического иммунного ответа [5, 8]. Повышение активности Th1-клеток при БА может объясняться снижением числа регуляторных Т-клеток, которые в норме угнетают Th2-лимфоциты [2]. В нашем исследовании выявлено снижение содержания естественных регуляторных Т-клеток при трудно поддающейся лечению БА по сравнению с контролируемой БА ($p<0,05$) и группой контроля ($p<0,01$).

Особенностями трудно поддающейся лечению БА являются увеличение числа нейтрофилов, поражение бронхов мелкого калибра и более выраженные структурные изменения бронхиального дерева [2]. Естественные киллерные клетки с фенотипом $CD16^+$ (natural killer, NK) - мононуклеары, экспрессирующие CD 16 (мембранный низкоаффинный рецептор для IgG), - представляют собой особую популяцию лимфоцитов - больших гранулярных лимфоцитов. Эти клетки обладают уникальной

способностью лизировать клетки-мишени, инфицированные вирусами и другими внутриклеточными микроорганизмами, мутировавшие опухолевые клетки, любые другие чужеродные клетки аллогенного или ксеногенного происхождения, попавшие в организм человека при гемотрансфузии, трансплантации органов [3,7]. Другой важной функцией НК-клеток является участие в общем каскаде синтеза цитокинов, активирующих новых участников иммунной защиты. Они обладают способностью продуцировать IFN- α и IFN- γ , GM-CSF, IL-3, IL-8 и другие хемокины [3, 7]. Естественные киллерные клетки вносят вклад в фазу сенсibilизации при аллергенспецифическом адаптивном иммунном ответе, в баланс между Th1 и Th2-типами ответа, а также в разрешение продолжающегося воспаления и могут, как содействовать воспалению дыхательных путей при аллергической астме, так и контролировать заболевание, внося свой вклад в аллергенспецифическую иммунную супрессию, аллергенспецифическую генерацию Th1-клеток и продукцию IgE [7, 9]. Согласно данным нашего исследования содержание естественных киллерных клеток с фенотипом CD16⁺ снижено при трудно поддающейся лечению БА по сравнению с контролируемой ($p < 0,05$) и неконтролируемой ($p < 0,01$) БА, а также группой контроля ($p < 0,05$).

Заключение

У пациентов с трудно поддающейся лечению БА установлено снижение содержания естественных регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{hi}) по сравнению с контролируемой БА и группой контроля, а также снижение содержания естественных киллерных клеток с фенотипом CD16⁺ по сравнению с контролируемой БА, неконтролируемой БА и группой контроля. Выявленные особенности клеточного иммунитета у пациентов с трудно поддающейся лечению БА могут определять течение заболевания и обосновывать целесообразность проведения дополнительных диагностических и лечебных мероприятий.

Литература:

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2014) / пер. с англ. под ред. А.С. Белевского. - М. : Российское респираторное общество, 2015. - 148 е., ил.
2. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2011) / под ред. А.С. Белевского. - М. : Российское респираторное общество, 2012. - 108 е., ил.
3. Черний, В.И. Нарушения иммунитета при критических состояниях / В.И. Черний, А.Н. Нестеренко / Внутренняя медицина. - 2007. - № 2 (2).
4. Can guideline-defined asthma control be achieved? The Gaining Optimal Asthma Control study / E.D. Bateman [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. - 2004. - Vol.170. - P. 836-844.
5. Chung, K.F. Cytokines in asthma / K.F. Chung, P.J. Barnes // Thorax. - 1999. - Vol. 54, № 9. - p. 825-857.
6. Global strategy for asthma management and prevention (GINA) [Electronic resource] / Updated 2015. - Mode of access: <http://www.ginasthma.org>. - 31.03.2016. - 135 p.
7. Karimi, K. Natural killer cells in asthma / K. Karimi, P. Forsythe // Frontiers in Immunology. - 2013. - Vol.4. - P. 1-8.
8. Larche, M. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma / M. Larche, D.S. Robinson, A.B. Kay // J. Allergy Clin. Immunol. - 2003. - Vol.111, № 3. - P. 450-463.
9. Natural killer cells in allergic inflammation / G. Erten [et al.] // Chem. Immunol. Allergy. - 2014. - Vol.94. - P. 48-57.