Ситдикова Татьяна Сергеевна

заведующая отделением, врач аллерголог-иммунолог

Городской аллерго-респираторный центр

КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр»

аспирант

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный

медицинский университет» Минздрава России

г. Владивосток, Приморский край

Просекова Елена Викторовна

д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный

медицинский университет» Минздрава России

г. Владивосток, Приморский край

DOI 10.21661/r-117817

ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ФЕНОТИПАМИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

***Аннотация:** в данной статье рассмотрены особенности функционирования иммунокомпетентных клеток у детей с различными фенотипами бронхиальной астмы. Обоснована актуальность исследуемой темы. Обозначены цель, материалы и методы исследования. Обобщены результаты исследования иммунологических показателей у детей при бронхиальной астме.*

***Ключевые слова:** иммунокомпетентные клетки, фенотипы, бронхиальная астма, проточная цитометрия, дети.*

У детей с верифицированным диагнозом атопической и вирусиндуцированной бронхиальной астмы в возрасте 3–11 лет ($n = 50$) проведена оценка количественных и функциональных показателей иммунокомпетентных клеток периферической крови, группу контроля составили здоровые сверстники ($n = 25$). Сравнительный анализ количественных и функциональных показателей клеточной активации иммунокомпетентных клеток, отражающий эффективность работы

иммунной системы, проводили с помощью многопараметрового проточного цитофлюориметра «COULTER EPICS XL» фирмы Beckman Coulter Inc с подбором панелей моноклональных антител с многоцветной комбинацией флюорохромов и обработкой цифровых данных по программе «Statistica 10», с достоверностью 95–99%.

При бронхиальной астме у детей выявлен дисбаланс в обеспечении и функционировании иммунокомпетентных клеток в зависимости от фенотипа заболевания. У детей с вирусиндуцированным фенотипом БА зафиксировано увеличение количества лейкоцитов в периферической крови с высоким удельным весом нейтрофилов, дисбаланс регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов с увеличением и активацией субпопуляции Т-хелперов ($CD3^+CD4^+$), при дефиците Т-цитотоксических клеток ($CD3^+CD8^+$), натуральных киллеров (NK-клетки $CD3^+/CD16^+CD56^+$) и цитолитических NKT-клеток ($CD3^+/CD16^+CD56^+$).

Актуальность. Иммунологические показатели отражают реакции организма на воздействие физиологических или патологических факторов, активацию или истощение иммунной системы [6, с. 47–48]. В реализации ряда заболеваний, включая аллергические, патогенетическая роль принадлежит измененным функциям иммунной системы с нарушением количественной обеспеченности и функциональной активности иммунорегуляторных клеток [4, с. 7–14, 11, с. 239–248]. Патогенетическая значимость иммунных и цитокиновых механизмов в воспалении определяет актуальность и информативность мониторинга иммунологических показателей при аллергических заболеваниях. В развитии фенотипов бронхиальной астмы, в группу определяющих факторов включают цитокиновую дисрегуляцию и клеточный профиль иммунного ответа [8, с. 138–142; 3, с. 35–44; 11, с. 239–248]. Цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом $CD3^+CD8^+$ осуществляют специфическую защиту организма от внутриклеточных патогенов или собственных измененных клеток [5, с. 525–538; 11, с. 239–248]. Диагностически информативен анализ иммунных механизмов защиты, опосредованных натуральными киллерами, цитотоксическими Т-клетками при реализации различных фенотипов бронхиальной астмы у детей.

Цель настоящего исследования – выявление особенностей функционирования иммунокомпетентных клеток у детей с различными фенотипами бронхиальной астмы.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе Городского аллерго-респираторного центра и центра здоровья КГБУЗ «Владивостокский клинико-диагностический центр» (главный врач А.А. Кабиева) в группе детей (в возрасте 3–11 лет) с верифицированным диагнозом бронхиальной астмы с атопическим ($n = 25$), вирусиндуцированным ($n = 25$) фенотипами. В контрольную группу включены здоровые сверстники г. Владивостока ($n = 25$), не имеющие в течение предшествующего месяца острых заболеваний и фармакологического лечения. Клинико-лабораторное обследование осуществляли на кафедре клинической лабораторной диагностики, общей и клинической иммунологии ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России (ректор В.Б. Шуматов) и в иммунологической лаборатории краевого клинического центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями ГБУЗ «ККБ №2» (заведующая С.П. Кругляк). Дизайн исследования одобрен Междисциплинарным комитетом по этике ФГБОУ ВО ТГМУ Минздрава России от 24.04.2015 года, протокол №8.

Для исследования иммунологических параметров материалом являлась венозная кровь. Анализ лейкоцитов, характеристики субпопуляционного состава лимфоцитов, процессов активации клеток периферической крови проводили с помощью многопараметрового проточного цитофлюориметра «COULTER EPICS XL» фирмы Beckman Coulter Inc, станции для подготовки проб Coulter Prep Plus и Coulter TO-prep с подбором панелей моноклональных антител с многоцветной комбинацией флюорохромов с использованием флюорисцентных частиц Flow Count. Определяли Т-клетки, Т-хелперы, Т-цитотоксические, регуляторный индекс, В-клетки, натуральные киллеры (NK-клетки), цитолитические Т-клетки (NKT-клетки) и активированные Т- и В-клетки ($CD3^+/CD19^-$, $CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD3^-/CD19^+$, $CD3^-/CD16^+ CD56^+$, $CD3^+/CD16^+ CD56^+$, $CD3^+/HLA-DR^+$, $CD3^-/HLA-DR^+$)

Для статистической обработки всех цифровых данных использовали методы описательной, параметрической и непараметрической статистики программы «Statistica 10», с подсчетом: средней арифметической (М), медианы, среднего квадратичного отклонения (σ), средней ошибки средней арифметической ($\pm m$), доверительного интервала (ДИ), коэффициента достоверности показателя (t) и различий (t и p). Объем выполненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95–99%.

Результаты. Проведенные исследования зафиксировали различия обеспеченности и функционирования иммунокомпетентных клеток у детей с бронхиальной астмы по сравнению со здоровыми сверстниками (табл. 1) и в зависимости от фенотипа заболевания (табл. 2). При бронхиальной астме у детей в периферической крови, по сравнению со здоровыми сверстниками, достоверно выше число лейкоцитов с преобладанием нейтрофильных гранулоцитов (ДИ 7,63–8,78 $\cdot 10^9/\text{л}$ и 6,83–7,27 $\cdot 10^9/\text{л}$; 4,13–5,25 $\cdot 10^9/\text{л}$ и 3,19–4,16 $\cdot 10^9/\text{л}$ соответственно при $p < 0,05$) (табл. 1).

Таблица 1

Показатели иммунокомпетентных клеток в периферической крови
здоровых детей и детей с бронхиальной астмой

№	Показатели, единицы измерения удельного веса и абсолютного числа		Группы наблюдения				Критерий Стью-дента
			Здоровые дети (n = 25)		Дети с БА (n = 50)		
			М ± m	ДИ	М ± m	ДИ	
1	Лейкоциты	10^9/л	7,28 ± 0,27	6,83–7,27	8,21 ± 0,34	7,63–8,78	2,128 (p<0,05)
2	Лимфоциты	%	44,49 ± 1,56	41,8–47,09	38,26 ± 1,67	35,48–41,04	2,715 (p<0,05)
		10^9/л	3,41 ± 0,16	3,14–3,69	2,88 ± 0,17	2,60–3,16	2,254 (p<0,05)
3	Нейтрофилы	%	47,33 ± 1,69	44,52–50,13	53,43 ± 1,96	50,17–56,69	2,357 (p<0,05)
		10^9/л	3,67 ± 0,29	3,19–4,16	4,69 ± 0,33	4,13–5,25	2,285 (p<0,05)
4	Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	39,54 ± 1,24	37,46–41,61	35,27 ± 1,59	36,62–37,92	2,102 (p<0,05)
		кл/мкл	1197 ± 86,46	1053,63–1340,68	918,36 ± 68,32	804,94–1031,77	2,530 (p<0,05)

5	Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	27,13 ± 1,10	25,29–28,97	23,48 ± 1,36	21,21–25,75	2,071 (p<0,05)
		кл/мкл	890,84 ± 52,34	803,94–977,73	724,32 ± 57,20	629,35–819,28	2,147 (p<0,05)
6	Цитолитические NK-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	10,95 ± 1,09	9,14–12,77	7,27 ± 0,75	6,01–8,53	2,765 (p<0,05)
		кл/мкл	361,28 ± 40,17	294,59–427,96	260,52 ± 28,91	212,52–308,51	2,035 (p<0,05)
7	Цитолитические NKT-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	6,62 ± 0,58	5,68–7,61	4,59 ± 0,47	3,81–5,37	2,753 (p<0,05)
		кл/мкл	209,80 ± 16,55	182,31–237,28	143,84 ± 21,33	108,41–179,26	2,442 (p<0,05)

При наличии БА у детей определялось снижение удельного веса и абсолютного количества лимфоцитов, дисбаланс регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов при снижении клеток CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ в сочетании с дефицитом натуральных киллеров, цитолитических Т-лимфоцитов (табл. 1). Выявленные у детей с БА изменения в субпопуляционном составе Т-лимфоцитов иллюстрируют дисбаланс иммунного ответа и функционирования Т-клеточного звена, вызванного миграцией клеток в зону персистирующего воспаления [1, с. 100–103; 9, с. 71–75; 11, с. 239–248].

Особенности структуры и количественных характеристик иммунокомпетентных клеток различались и варьировали в зависимости от фенотипа бронхиальной астмы (табл. 2).

При atopическом фенотипе бронхиальной астмы у детей в периферической крови по сравнению с показателями здоровых детей зафиксировано снижение общей обеспеченности лимфоцитов и популяции Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) при активации цитолитических NKT-клеток (CD3⁺/CD16⁺CD56⁺) (табл. 1, 2).

У детей, с вирусиндуцированным развитием и инфекционно-зависимой триггерностью заболевания, обеспеченность лейкоцитами и Т-хелперами достоверно выше показателей здоровых детей и детей с atopическим фенотипом бронхиальной астмы в сочетании с дефицитом цитотоксических Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и цитолитических NKT-клеток (CD3⁺/CD16⁺CD56⁺) (табл. 1, 2).

Показатели иммунокомпетентных клеток в периферической крови
детей с различными фенотипами бронхиальной астмы

№	Показатели, единицы измерения удельного веса и абсолютного числа		Дети с различными фенотипами бронхиальной астмы				Критерий Стьюдента
			Атопический (n = 25)		Вирусиндуцированный (n = 25)		
			М ± m	ДИ	М ± m	ДИ	t *
1	Лейкоциты	10^9/л	7,60 ± 0,37	6,98–8,22	8,92 ± 0,42	8,21–9,63	2,319 (p<0,01)
2	Лимфоциты	%	36,18 ± 2,08	32,72–39,65	46,08 ± 2,08	42,61–49,54	3,350 (p<0,001)
		10^9/л	2,86 ± 0,23	2,47–3,25	3,94 ± 0,19	3,62–4,26	3,53 (p<0,01)
3	Нейтрофилы	%	54,8 ± 2,28	51,05–58,64	47,34 ± 1,90	44,18–50,50	2,521 (p<0,01)
		10^9/л	4,54 ± 0,35	3,96–5,12	3,41 ± 0,21	3,06–3,76	2,749 (p<0,01)
4	Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	36,07 ± 1,82	33,04–39,10	43,05 ± 1,65	40,30–45,80	2,834 (p<0,01)
		кл/мкл	1008,46 ± 84,86	867,59–1149,34	1390,80 ± 107,72	1211,97–15,69,62	2,782 (p<0,01)
5	Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	30,94 ± 1,66	28,18–33,70	25,54 ± 1,87	22,43–28,66	2,154 (p<0,05)
		кл/мкл	894,93 ± 95,65	736,139–1053,72	605,66 ± 62,00	502,74–708,58	2,537 (p<0,05)
6	Цитолитические NK-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	12,56 ± 0,98	10,92–14,20	8,80 ± 0,94	7,23–10,36	2,761 (p<0,05)
		кл/мкл	348,53 ± 33,20	293,40–403,65	262,66 ± 25,12	220,96–304,36	2,062 (p<0,05)
7	Цитолитические NKT-клетки CD3 ⁺ /CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	7,14 ± 0,86	5,71–8,57	4,78 ± 0,50	3,93–5,62	2,36 (p<0,01)
		кл/мкл	200,80 ± 30,93	149,44–252,15	133,26 ± 12,60	112,34–154,18	2,02 (p<0,05)

Truyen E. с соавторами (2010) отмечают важную роль натуральных киллеров Т-лимфоцитов в развитии гиперреактивности дыхательных путей, эозинофильном воспалении и в патогенезе астмы [11, с. 239–248].

Количественные показатели иммунокомпетентных клеток с функциями натуральных киллеров, цитотоксических и цитолитических Т-лимфоцитов у детей, при инфекционно-зависимом варианте течения бронхиальной астмы, были

достоверно ниже таковых не только по сравнению со здоровыми сверстниками, но и по отношению к показателям детей с atopическим вариантом течения болезни (табл. 1, 2).

Дефицит НК-клеток может приводить к развитию острых респираторных инфекций, что является провоцирующим фактором для воспалительного процесса у больных БА [2, с. 273–278; 10, с.8–11].

Выводы:

1. При бронхиальной астме у детей фиксируется дисбаланс в обеспечении и функционировании иммунокомпетентных клеток в зависимости от фенотипа заболевания.

2. Атопический фенотип бронхиальной астмы у детей характеризуется снижением общего числа лимфоцитов и Т-хелперов, увеличением числа и активацией цитолитических НКТ-клеток.

3. При вирусиндуцированном фенотипе бронхиальной астмы у детей в периферической крови зафиксировано увеличение количества лейкоцитов с высоким удельным весом нейтрофильных гранулоцитов, дефицит Т-цитотоксических клеток, натуральных киллеров и цитолитических НКТ-клеток при активации Т-хелперов.

Список литературы

1. Алиева В.Э. Особенности иммунного статуса и цитокинового профиля у детей с бронхиальной астмой / В.Э. Алиева // Астма. – 2010. – Т. 11. – №2. – С. 100–103.

2. Андрейчикова Е.А. Состояние системного иммунитета у больных аллергической бронхиальной астмой республики Хакасии / Е.А. Андрейчикова, Ю.А. Сенникова, В.А. Козлов // Медицинская иммунология. – 2009. – Т. 11. – №2–3. – С. 273–278.

3. Антонович Ж.В. Естественные Т-клетки и цитокины у больных бронхиальной астмой в разные периоды заболевания / Ж.В. Антонович, В.П. Царев, Н.В. Гончарова // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2009. – №4. – С. 35–44.

4. Козлов В.А. Клетки-супрессоры – основа аутоиммунных заболеваний / В.А. Козлов // Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18. – №1. – С. 7–14.
5. Кудрявцев И.В. Определение основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом многоцветной проточной цитометрии / И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, И.И. Кробинец [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – №6. – С. 525–538.
6. Просекова Е.В. Роль Т- и В-лимфоцитов в реализации вирусиндуцированной астмы у детей / Е.В. Просекова, Т.С. Ситдикова, А.И. Турянская // Научно-практическая ревматология. – 2016. – №54. – С. 47–48.
7. Скибо Ю.В. Структура основных популяций лимфоцитов у больных атопической бронхиальной астмой разной степени тяжести / Ю.В. Скибо, Н.Ш. Курмаева, В.Н. Цибулькина, З.И. Абрамова // Практическая медицина. – 2012. – №9 (65). – С. 154–158.
8. Суханова Н.А. Особенности показателей иммунитета у детей с бронхиальной астмой / Н.А. Суханова // Российская оториноларингология. – 2011. – С. 138–142.
9. Чикилева И.О. Особенности фенотипа лимфоцитов больных бронхиальной астмой в период обострения / И.О. Чикилева, М.В. Киселевский, Т.В. Борисова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – №3. – Т. 10. – С. 71–75.
10. Швец Е.А. Клинико-иммунологические характеристики при синдроме бронхиальной обструкции у детей / Е.А. Швец, В.Г. Саватеева, Е.И. Васильева // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – №2. – С. 8–11.
11. Truyen E. Association between sputum natural killer T-cells and eosinophilic airway inflammation in human asthma / E. Truyen, L. Coteur, E. Dilissen // Int Arch Allergy Immunol. – 2010. – №153. – P. 239–248.