

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ АЛЛЕРГИЧЕСКОГО БРОНХОЛЕГОЧНОГО АСПЕРГИЛЛЕЗА У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

¹Козлова Я.И. (доцент кафедры)*, ²Учеваткина А.В. (с.н.с.), ²Фролова Е.В. (зав. лаб.), ²Филиппова Л.В. (с.н.с.), ²Аак О.В. (в.н.с.), ¹Понная В.В. (студент), ¹Соболев А.В. (профессор кафедры), ¹Климко Н.Н. (зав. кафедрой)

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова: ¹ кафедра клинической микологии, аллергологии и иммунологии и ²НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, Санкт-Петербург, Россия

© Коллектив авторов, 2016

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus spp.*, которое осложняет течение бронхиальной астмы (БА) и муковисцидоза. По оценкам экспертов, количество больных АБЛА в мире составляет около четырех миллионов человек, в Российской Федерации – сто семьдесят пять тысяч. Иммунопатогенез АБЛА у больных БА изучен недостаточно. Нами проведено иммунофенотипирование лимфоцитов методом проточной цитометрии и исследование продукции цитокинов у больных АБЛА и БА. Установлены однонаправленные изменения: снижение абсолютного и относительного количества NK-клеток, продукции IFN- α и IFN- γ , повышение числа NKT-клеток и общего уровня IgE. У больных АБЛА выявили повышенную продукцию IL-10 на фоне угнетения выработки IFN- γ в ответ на аллергены *A. fumigatus*. Таким образом, уровни цитокинов могут служить прогностическими биомаркерами течения заболевания и быть использованы при мониторинге терапии АБЛА.

Ключевые слова: аллергический бронхолегочный аспергиллез, *Aspergillus spp.*, бронхиальная астма, лимфоциты, цитокины

IMMUNOLOGICAL FEATURES OF ALLERGIC BRONCHOPULMONARY ASPERGILLOSIS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

¹Kozlova Y.I. (associate professor of the chair), ²Uchevatkina A.E. (senior scientific collaborator), ²Frolova E.V. (head of the laboratory), ²Filippova L.V. (senior scientific collaborator), ²Aak O.V. (leading scientific collaborator), ¹Ponnaya V.V. (student), ¹Sobolev A.V. (professor of the chair), ¹Klimko N.N. (head of the chair)

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov: ¹Chair of Clinical Mycology, Allergy and Immunology and ²Kashkin Research Institute of Medical Mycology, St. Petersburg, Russia

© Collective of authors, 2016

Allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) is a lung disease caused by hypersensitivity to *Aspergillus spp.*, which complicates the course of bronchial asthma and cystic fibrosis. According to experts, the number of patients with ABPA in the world is about four million people, in the Russian

Federation – one hundred seventy-five thousand. The immunopathogenesis of ABPA in patients with asthma is studied insufficiently. We carried out the immunophenotyping of lymphocytes by flow cytometry and study of cytokine production in patients with ABPA and asthma. Unidirectional changes were established: the decrease of the absolute and relative amount of NK-cells, production of IFN- α and IFN- γ , increase of the NKT cells number and of the total IgE levels. In patients with ABPA was revealed the increased of IL-10 production on the background of reduce secretion of IFN- γ in response to the allergens of *A. fumigatus*. Thus, the cytokine levels may serve as predictive biomarkers of disease and to be used in monitoring of ABPA therapy.

Key words: allergic bronchopulmonary aspergillosis, *Aspergillus spp.*, bronchial asthma, cytokines, lymphocytes

ВВЕДЕНИЕ

Аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА) – заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к *Aspergillus spp.*, которое осложняет течение бронхиальной астмы и муковисцидоза [1, 2]. По оценкам экспертов, количество больных АБЛА в мире составляет около четырех миллионов человек, а в Российской Федерации – порядка ста семидесяти пяти тысяч [3, 4]. Для АБЛА характерны разнообразные клинические и рентгенологические проявления, которые обычно сопровождаются неконтролируемой бронхиальной астмой, рецидивирующими легочными инфильтратами, бронхоэктазами и прогрессирующей дыхательной недостаточностью [5]. При обострении АБЛА у пациентов наблюдают лихорадку, свистящие хрипы, кровохарканье и продуктивный кашель с мокротой, содержащей коричневатые-черные слизистые пробки [6-8].

Плесневые грибы *Aspergillus spp.* чрезвычайно широко распространены в окружающей среде и могут быть источником аллергенов как на открытом воздухе, так и внутри помещений. Колонизируя бронхиальное дерево, конидии грибов активируют иммунный ответ. Вначале клетки врожденной иммунной системы начинают распознавать микромицеты посредством паттерн распознающих рецепторов (PRRs), таких как Toll-подобные рецепторы (TLRs), лектиновые рецепторы С-типа (CLRs) и NOD-рецепторы (*Nucleotide Oligomerization Domain* – домен олигомеризации нуклеотидов) [9]. Связывание *Aspergillus spp.* с PRRs активирует внутриклеточные сигнальные пути дендритных клеток, что приводит к выработке хемокинов и цитокинов, ответственных за формирование различных типов адаптивного иммунного ответа. Считают, что в патогенезе АБЛА ведущую роль играет существенное усиление активности Т-хелперов 2 типа, в результате чего развивается эозинофилия, гиперпродукция слизи и переключение синтеза иммуноглобулинов на IgE класс. Впоследствии воспалительная реакция приводит к гиперчувствительности дыхательных путей, которая клинически проявляется типичными астматическими симптомами, такими как приступы бронхиальной обструкции, кашель и одышка. Таким образом, многие исследователи считают, что сенсибилизация к *Aspergillus spp.* у пациентов с БА существенно усугубляет дисбаланс Th2/Th1 и поддерживает хроническое аллергическое воспаление при АБЛА [10, 11]. Однако количество публикаций по этой теме ограничено, а патогенетические механизмы АБЛА требуют дальнейшего изучения.

Цель исследования – изучить иммунологические показатели аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой.

* Контактное лицо: Козлова Яна Игоревна, тел.: (812) 303-51-46

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование включили две группы пациентов. Первую группу составили 11 больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (мужчин – 2, женщин – 9; медиана возраста – 38 лет), который развился на фоне тяжелой бронхиальной астмы; вторую группу – 15 больных тяжелой бронхиальной астмой (мужчин – 3, женщин – 12; медиана возраста – 45 лет).

Обследование пациентов включало сбор анамнестических данных (первые симптомы заболевания и время их появления, динамика развития, возможный контакт с плесневыми грибами дома или на работе, наличие аллергических реакций, наследственность по атопии, предшествующая терапия и ее эффективность, и т.д.), а также оценку результатов общеклинических, лабораторных, инструментальных методов диагностики. Для выявления микогенной сенсибилизации и АБЛА всем больным бронхиальной астмой проводили специфическое аллергологическое обследование – кожное тестирование с 6 грибковыми аллергенами: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida* («Allergopharma», Германия). В сыворотке крови методом иммуноферментного анализа определяли уровень общего IgE (ООО «Полигност», Россия) и специфических IgE (sIgE) к грибковым аллергенам (панель биотинилированных аллергенов «Алкор Био», Россия). Микологическое обследование состояло из микроскопии и культурального исследования образцов респираторных биосубстратов (мокрота, бронхоальвеолярный лаваж /БАЛ/). При подозрении на АБЛА выполняли компьютерную томографию (КТ) органов грудной клетки. Уровень контроля симптомов и степень тяжести БА выявляли в соответствии с критериями «Глобальной стратегии лечения и профилактики бронхиальной астмы» (GINA, 2014). Диагноз АБЛА устанавливали на основании критериев R. Agarwal et al., 2013 г. [12]. Контрольную группу составили 18 условно здоровых людей (медиана возраста – 37,5 лет, мужчин – 5, женщин – 13).

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили методом проточной цитометрии с применением проточного цитометра «FC-500» (Beckman Coulter, США) с программным обеспечением CXP Software. Лимфоциты окрашивали моноклональными антителами, мечеными флуорохромами: CD45-FITC, CD4-RD1, CD8-ECD, CD3-PC5, CD19-ECD и CD56-RD1 (Beckman Coulter, США). Для дополнительной характеристики Т-клеточного звена иммунной системы вычисляли иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – соотношение CD3+CD4+/CD3+CD8+.

Для исследования спонтанной и индуцированной продукции IFN- γ и IFN- α использовали гепаринизированную кровь, разведенную в 5 раз полной питательной средой (ППС): среда RPMI 1640 с добавлением L-глутамин («Биолот», Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «Биолот», Россия). Для спонтанной продукции интерферонов в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл ППС и 100 мкл разведенной в 5 раз крови. Для индуцированной продукции интерферонов в лунки планшета помещали по 100 мкл разведенной в 5 раз крови и, соответственно, добавляли 100 мкл рабочего раствора фитогемагглютина (ФГА) («Sigma», США)

или вирус болезни Ньюкасла (цитолитический титр 1/256, ФГБУ «НИИ гриппа», Россия) в конечной дозе 25 мкг/мл. Планшеты с исследуемыми образцами культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Через 24 часа надосадочную жидкость отбирали для исследования спонтанной и индуцированной продукции интерферонов.

С целью изучения антиген-специфической продукции IFN- γ , IL-4 и IL-10 было проведено сравнение способности цельной крови и выделенных мононуклеарных клеток к синтезу цитокинов в ответ на стимуляцию аллергеном *A. fumigatus*. Мононуклеарные клетки крови (МНК) выделяли на градиенте плотности с использованием лимфолита (Lympholyte-N, Cedarlane, США): кровь разводили в 2 раза фосфатно-солевым буфером (ФСБ, «ЭКО сервис», Россия), наслаивали на лимфолит в соотношении 4 : 1,5 и центрифугировали 40 мин при 1500 об/мин. МНК отмывали 2 раза ФСБ и разводили до концентрации 1·10⁶кл/мл ППС.

Для спонтанной продукции цитокинов в лунки 96-луночного планшета вносили по 100 мкл ППС и 100 мкл разведенной в 5 раз крови или 100 мкл 1·10⁵ МНК. Для антиген-индуцированной выработки цитокинов к 100 мкл разведенной в 5 раз крови или 1·10⁶ МНК добавляли 100 мкл аллергена *A. fumigatus* («Алкор Био», Россия), разведенного ППС 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 хранили при -20 °С до проведения анализа.

Интерфероны и цитокины в надосадочной жидкости выявляли с помощью иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Полученные оптические плотности определяли на иммуноферментном анализаторе Human (Германия). Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл.

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы STATISTICA 10. Данные представляли в виде медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, Lq и Hq). Для оценки различий между независимыми выборками применяли непараметрический критерий Манна-Уитни. Достоверными различиями сравниваемых параметров считали значения $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время описаны две группы риска развития АБЛА: бронхиальная астма и муковисцидоз. По данным международных исследований, частота развития АБЛА у больных бронхиальной астмой составляет 12,9% [13], муковисцидозом – 8,9% [14]. Для данных категорий пациентов характерны нарушения защитных механизмов слизистых оболочек дыхательных путей, в том числе дефекты мукоцилиарного клиренса и функции эпителиальных клеток [15]. Все это облегчает колонизацию дыхательных путей грибковыми спорами. У всех больных АБЛА, включенных нами в исследование, заболевание сформировалось на фоне атопической бронхиальной астмы. Также у всех пациентов

этой группы была отягощенная наследственность по атопии. Кроме того, на основании данных анамнеза, у шести человек выявлен контакт с плесневыми грибами дома или на работе. АБЛА – хроническое рецидивирующее заболевание, которое протекает с чередованием периодов обострений и ремиссий. С момента установления диагноза средняя продолжительность АБЛА у обследованных нами больных составила 4,7 лет.

Микогенная сенсибилизация – важный этап в патогенезе АБЛА. Поэтому обязательным диагностическим критерием служит положительная кожная проба и/или выявление sIgE к *Aspergillus* spp. в сыворотке крови > 0,35 МЕ/мл [1, 3, 5, 12]. В группе АБЛА у всех пациентов кожная проба с аллергеном *A. fumigatus* была положительная, уровень sIgE к *Aspergillus* spp. повышен – Ме 4,59 (0,48 ÷ 13,1) МЕ/мл. В группе больных тяжелой бронхиальной астмой получены отрицательные результаты кожного тестирования с грибковыми аллергенами, уровень sIgE к *Aspergillus* spp. составил Ме 0,02 (0,01 ÷ 0,02) МЕ/мл и был достоверно ниже, чем в группе АБЛА (p=0,0006).

Известно, что у больных АБЛА уровень общего IgE может достигать чрезвычайно высоких значений, отражая продолжительную аллергенную стимуляцию гуморального иммунного ответа [5, 12]. В ходе нашего исследования по уровню данного показателя в группе пациентов с АБЛА и тяжелой БА получены достоверные различия (p=0,0002). У больных АБЛА установлено значительное повышение уровня общего IgE – Ме 963 (954 ÷ 1691) МЕ/мл, во второй группе этот показатель был значительно ниже – Ме 68 (10,0 ÷ 600,0) МЕ/мл.

В то время как многочисленные современные исследования посвящены изучению иммунологических изменений, которые лежат в основе патогенеза БА [16, 17], работ, направленных на оценку количества и функциональной активности лимфоцитов при развитии АБЛА, недостаточно. Сравнительная характеристика иммунологических показателей больных АБЛА, тяжелой БА и лиц контрольной группы представлена в таблице 1.

Таблица 1

Сравнительная характеристика иммунологических показателей у больных бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом

Группы Показатели	Больные АБЛА, n=11	Больные БА, n=15	Условно здоровые лица, n=18
	Ме (Lq-Hq)		
Возраст, лет	38,0 (30,0÷61,0)	45,0 (25,0÷54,0)	37,5 (33,0÷45,0)
Лейкоциты (x10 ⁹ /л)	6,8 (6,2÷8,5)*	6,6 (5,2÷8,5)	5,6 (5,2÷6,6)
Лимфоциты (x10 ⁹ /л)	1,86 (1,34÷2,45)	1,97 (1,55÷2,94)	2,22 (1,89÷2,46)
CD3+CD19- (%)	78,0 (67,0÷79,0)	78,0 (70,0÷82,0)	75,5 (72,0÷79,0)
CD3+CD19- (x10 ⁹ /л)	1,49 (0,93÷1,77)	1,56 (1,19÷2,48)	1,67 (1,37÷1,91)
CD3+CD4+ (%)	46,0 (39,0÷54,0)	46,0 (40,0÷54,0)	44,5 (39,0÷46,0)
CD3+CD4+ (x10 ⁹ /л)	0,91 (0,62÷1,10)	0,92 (0,67÷1,35)	0,98 (0,81÷1,13)
CD3+CD8+ (%)	25,0 (22,0÷31,0)	24,0 (19,0÷36,0)	26,5 (22,0÷31,0)
CD3+CD8+ (x10 ⁹ /л)	0,54 (0,36÷0,67)	0,64 (0,41÷0,80)	0,56 (0,40÷0,74)
CD3-CD19+ (%)	9,0 (8,0÷13,0)	11,0 (9,0÷18,0)	11,0 (10,0÷12,0)
CD3-CD19+ (x10 ⁹ /л)	0,16 (0,12÷0,29)	0,25 (0,17÷0,35)	0,24 (0,20÷0,28)
CD3+CD4+CD25+ (%)	2,9 (2,3÷4,2)	2,7 (1,9÷5,0)	3,0 (2,2÷4,1)
CD3+CD4+ CD25+ (x10 ⁹ /л)	0,05 (0,04÷0,12)	0,06 (0,04÷0,10)	0,06 (0,05÷0,08)
CD3-CD56+ (%)	9,0 (6,3÷16,0)	9,0 (6,0÷11,0) *	11,0 (10,0÷14,0)
CD3-CD56+ (x10 ⁹ /л)	0,17 (0,12÷0,28)	0,17 (0,14÷0,24)*	0,25 (0,21÷0,29)
CD3+CD56+ (%)	4,2 (2,0÷5,4)	3,4 (1,5÷6,5) *	1,6 (1,1÷3,8)
CD3+CD56+ (x10 ⁹ /л)	0,09 (0,03÷0,11)	0,09 (0,04÷0,12)*	0,04 (0,02÷0,07)

ИРИ	1,6 (1,3÷2,5)	1,9 (1,2÷2,6)	1,6 (1,4÷2,4)
IFN-α инд (пг/мл)	166,0 (119,0÷234,0)*	106,0 (71,0÷160,0)*	246,0 (192,0÷387,0)
IFN-γ сп (пг/мл)	22,0 (6,0÷39,0)	2,0 (0,0÷11,0)	12,0 (5,0÷16,0)
IFN-γ инд (пг/мл)	668,0 (328,0÷1276,0)*	938,0 (616,0÷1900,0)	1935,5 (1822,0÷2080,0)

Примечание. Представлены медианные значения с интерквартильным размахом 25%÷75%; Ме (Lq-Hq)

*- достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p<0,05).

При иммунофенотипировании лимфоцитов у больных АБЛА и БА не выявили 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 установлено изменений в экспрессии маркера ранней активации (α-цепи рецептора интерлейкина-2) на Т-хелперах (CD3⁺CD4⁺CD25⁺) в обеих группах обследованных лиц. Полученные данные совпадают с результатами других исследований [18], что предполагает необходимость более углубленного изучения субпопуляций Т-лимфоцитов, которые включают в себя Th1, Th2, Th17, на основе уникального сочетания хемокиновых рецепторов с помощью многоцветного цитометрического анализа.

Особенностью больных БА, по сравнению с контрольной группой, было снижение абсолютного и относительного количества естественных киллеров или НК-клеток (Natural Killer cell) (CD3⁻56⁺) и повышение числа NKT-клеток (Natural Killer T-cell) (CD3⁺56⁺). В группе больных АБЛА снижение числа естественных киллеров отмечали в 72% случаев, а повышение количества NKT-клеток – в 56%. Однако из-за большого разброса данных статистически значимых различий с условно здоровыми лицами не наблюдали. Известно, что НК-клетки являются ранними продуцентами IFN-α и IFN-γ, участвующими в поляризации иммунного ответа по Th1 типу [19]. В нашем исследовании установлено ослабление способности клеток крови к продукции IFN-α в обеих группах пациентов, достоверное снижение секреции IFN-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 презентуемого антигена [20]. Считают, что при развитии аллергического воспалительного процесса NKT-клетки поддерживают активацию Th2, которые играют важную роль в патогенезе аллергических заболеваний.

В ходе исследования иммунологических показателей больных БА и АБЛА выявили однонаправленные изменения: снижение абсолютного и относительного количества НК-клеток, продукции IFN-α и IFN-γ, повышение числа NKT-клеток и общего уровня IgE. Таким образом, полученными данными подтверждено развитие у больных АБЛА и БА хронического аллергического воспалительного процесса. Тем не менее, этого недостаточно для оценки особенностей специфического иммунного ответа.

Цитокины, являясь трансммиттерами межклеточных взаимодействий, не только влияют на миграцию, активацию и выживаемость клеток, участвующих в воспалительной реакции, но и меняют приоритет эф-

факторов аллергических реакций и вызывают морфологические изменения в легочной ткани. На следующем этапе исследования провели сравнительный анализ уровней патогенетически значимых цитокинов, продуцируемых клетками цельной крови и МНК, в ответ на инкубацию с аллергеном *A. fumigatus*. Результаты определения цитокинов представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2

Показатели цитокинового статуса у больных бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (кровь 144 часа)

Показатели Группы	IFN-γ (пг/мл)		IL-10 (пг/мл)	
	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>
	Me(Lq-Hq)		Me(Lq-Hq)	
Больные АБЛА (n=7)	7,2 (3,5÷22,0)	27 (16,4÷59,0)	21,6 (15,7÷32)	72,2 (44,8÷108,2)*
Больные БА (n=6)	20,8 (20÷26)	28 (21÷41)	26,4 (24÷54)	8,2 (2÷25,2)
Контрольная группа (n=5)	20 (18÷24)	55 (40÷55)	20 (14÷45)	17 (8÷45)

Примечание: Представлены медианные значения с интерквартильным размахом 25%÷75%; Me(Lq-Hq)

* - достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p<0,05);

** - достоверность различий показателей между группами (p<0,05).

Таблица 3

Показатели цитокинового статуса у больных бронхиальной астмой и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (МНК 144 часа)

Показатели Группы	IFN-γ (пг/мл)		IL-10 (пг/мл)	
	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>	спонтанная	<i>A.fumigatus</i>
	Me(Lq-Hq)		Me(Lq-Hq)	
Больные АБЛА (n=7)	4,0 (2÷12,0)	25,5 (2÷34,6)	56 (15,2÷82)	57,0 (33,0÷87,0) *
Больные БА (n=6)	18,9 (8,2÷30,4)	5,8 (2÷26,6)*	52,5 (28,8÷146,0)*	42,6 (26,0÷94,0)
Контрольная группа (n=5)	34 (2÷41)	40 (19,8÷78)	18 (16÷26)	19 (16÷21)

Примечание: Представлены медианные значения с интерквартильным размахом 25% ÷ 75% - Me(Lq-Hq);

* - достоверность различий показателей по сравнению с контрольной группой (p < 0,05);

** - достоверность различий показателей между группами (p<0,05).

Нами, как и другими исследователями, не установлена способность аллергенов *A. fumigatus* стимулировать клетки крови к продукции IL-4 [21]. Предполагают, что это связано с тем, что IL-4 в большей степени участвует в инициации иммунного ответа по Th2 типу, в то время как IL-13 и IL-5 поддерживают дальнейшую поляризацию иммунного ответа [1]. При сравнении способности МНК и клеток цельной крови к спонтанной продукции IFN-γ и IL-10 не отмечали достоверных различий между исследуемыми группами. Стимуляция МНК и клеток периферической крови аллергеном *A. fumigatus* в течение 144 часов выявила различия в цитокиновом профиле между больными и условно здоровыми лицами. В контрольной группе грибковый аллерген стимулировал лимфоциты к продукции IFN-γ, но не к выработке IL-10, что подтверждено индексами стимуляции (ИС). ИС вычисляли как соот-

ношение индуцированной и спонтанной продукции цитокинов. ИС IFN-γ и IL-10 имели сходные значения: 2,75 и 1,0 – для клеток крови, 1,49 и 0,79 – для МНК соответственно. Полученные нами данные совпадают с результатами других авторов, которые оценивали способность клеток крови человека к продукции различных цитокинов в ответ на антигены *Aspergillus* spp. [22]. Показано, что у здоровых людей чаще выявляют *Aspergillus*-специфичные клоны Т-лимфоцитов, вырабатывающие IFN-γ и редко секретирующие IL-4, IL-17 и IL-10.

Не установлено достоверных отличий между спонтанной и индуцированной грибковым аллергеном продукцией IFN-γ и IL-10 у больных БА. Полученные данные могут быть показателем выраженной активации клонов Т-лимфоцитов, специфичных к другим аэроаллергенам, но не к микроспороам. Это подтверждено отсутствием у пациентов с БА sIgE к *A. fumigatus*. В нашем исследовании у больных АБЛА антиген-специфическая стимуляция выявила достоверно более высокую продукцию МНК и клетками периферической крови IL-10, по сравнению со значениями в группе контроля и БА, и тенденцию к снижению выработки IFN-γ.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что оценка продукции цитокинов клетками цельной крови и выделенными МНК имела сходную информативность. Это является подтверждением возможности использования цельной периферической крови для изучения цитокинового профиля больных АБЛА.

По данным цитокинового профиля пациентов с АБЛА отмечали усиление активности специфических к *A. fumigatus* регуляторных Т-лимфоцитов (Treg), что характерно для включения механизмов ограничения воспалительного процесса. Однако высокие уровни sIgE к *A. fumigatus* служат показателем того, что противовоспалительный цитокин IL-10 преимущественно подавляет продукцию IFN-γ, и это способствует преобладанию Th2-типа иммунного ответа у больных АБЛА. Полученные нами данные совпадают с результатами Becker K.L. и соавторов, которые установили, что пациенты с АБЛА, в отличие от больных БА, имели значительно более высокое соотношение *A. fumigatus* – специфичных Th2/Th1 [21].

Полученные данные согласуются с мнением, что именно сенсibilизация к *Aspergillus* spp. играет значительную роль в иммунопатологических механизмах, лежащих в основе патогенеза АБЛА. Следовательно, уровни цитокинов могут служить прогностическими биомаркерами течения заболевания и быть использованы при мониторинге терапии АБЛА.

ВЫВОДЫ

При изучении иммунологических показателей больных АБЛА и БА установлены однонаправленные изменения: снижение абсолютного и относительного количества НК-клеток, продукции IFN-α и IFN-γ, повышение числа NKT-клеток и общего уровня IgE.

АБЛА у больных БА формировалось на фоне повышенной продукции IL-10 при угнетении выработки IFN-γ в ответ на аллергены *A. fumigatus*.

Уровни IFN-γ и IL-10, индуцированных *Aspergillus* spp., могут быть прогностическими биомаркерами те-

чения АБЛА, которые можно применять для оценки эффективности лечения этого заболевания.

Для изучения цитокинового профиля больных

АБЛА возможно использовать не только выделенные мононуклеарные клетки, но и цельную периферическую кровь.

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. Denning D.W., Pleuvry A., Cole D.C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults // *Med Mycol.* – 2013. – Vol. 51. – P. 361-370.
4. Клишко 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. – Т. 16, №1. – С. 3-9.
5. Hogan C., Denning D.W. Allergic bronchopulmonary aspergillosis and related allergic syndromes // *Semin Respir. Crit. Care Med.* – 2011. – Vol. 32. – P. 682-692.
6. Agarwal R., Chakrabarti A. Clinical manifestations and natural history of allergic bronchopulmonary aspergillosis / In: *Aspergillosis: From Diagnosis to Prevention*. A.C. Pasqualotto (ed). – Springer, 2010. – P. 707-724.
7. Agarwal R., Gupta D., Aggarwal A.N., et al. Clinical significance of hyperattenuating mucoid impaction in allergic bronchopulmonary aspergillosis: an analysis of 155 patients // *Chest*. 2007. – Vol. 132. – P. 1183-1190.
8. Козлова Я.И., Соболев А.В., Фролова Е.В. и др. Аллергический бронхолегочный аспергиллез у больных бронхиальной астмой // *Российский аллергологический журнал*. – 2015. – №2. – С. 37-46.
9. Gresnigt M.S., Netea M.G., van de Veerdonk F.L. Pattern recognition receptors and their role in invasive aspergillosis // *Ann. N-Y Acad. Sci.* – 2012. – Vol. 1273. – P. 60-67.
10. Chai L.Y., van de Veerdonk F., Marijnissen R.J., et al. Anti-*Aspergillus* human host defense relies on type 1 T helper (Th1), rather than type 17 T helper (Th17), cellular immunity // *Immunology*. – 2010. – Vol. 130. – P. 46-54.
11. Bouzani M., Ok M., McCormick A., et al. Human NK cells display important antifungal activity against *Aspergillus fumigatus*, which is directly mediated by IFN-gamma release // *J. Immunol.* – 2011. – Vol. 187. – P. 1369-1376.
12. 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.
13. Agarwal R., Aggarwal A.N., Gupta D., Jindal, S.K. *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: Systematic review and meta-analysis // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* – 2009. – Vol. 13. – P. 936-944.
14. Maturu V.N., Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: Systematic review and meta-analysis // *Clin. Exp. Allergy*. – 2015. – Vol. 45. – P. 1765-1778.
15. Chaudhary N., Datta K., Askin F.B., et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation // *J. Respir. Crit. Care Med.* – 2012. – Vol. 185. – P. 301-310.
16. Broide D. Immunologic and inflammatory mechanisms that drive asthma progression to remodeling // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121. – P. 560-70.
17. Williams C. M., Hubeau S., Meara H. Cytokine Pathways in Allergic Disease // *Toxicologic Pathology*. – 2012. – Vol. 40. – P. 205-215.
18. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Местные и системные иммунные механизмы хронического воспаления у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести // *Медицинская Иммунология*. – 2009. – Т. 11, № 2-3. – С. 169-176.
19. Акинфиева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. NKT-клетки: Характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа // *Онкогематология*. – 2010. – №4. – С. 39-46.
20. Margalit A., Kavanagh K. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2015. – Vol. 39. – P. 670-687.
21. 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.
22. Jolink H., Meijssen I.C., Hagedoorn R.S. et al. Characterization of the T-cell mediated immune response against the *Aspergillus fumigatus* proteins Crf1 and catalase 1 in healthy individuals // *J. Infect. Dis.* – 2013. – Vol. 208. – P. 847-856.

Поступила в редакцию журнала 23.11.2016

Рецензент: В.С. Митрофанов

