

ВЫЯВЛЕНИЕ АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКИХ ГОРМОНОРЕЗИСТЕНТНЫХ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ

Калашникова А.А.¹, Бычкова Н.В.¹, Давыдова Н.И.¹,
Жданова М.В.², Евлоева М.К.², Новик Г.А.²

¹ ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, НИЛ клеточного и гуморального иммунитета, Санкт-Петербург

² ГОУ ВПО Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия Росздрава, Санкт-Петербург

Резюме. В настоящее время основной целью терапии бронхиальной астмы (БА) является достижение полного контроля заболевания, для оценки которого используется комплекс клинических и функциональных показателей (инструментальных и лабораторных исследований). Широкое применение в лечении детей с бронхиальной астмой ингаляционных глюкокортикостероидов, потребность в длительной терапии нередко и высокими дозами ингаляционных глюкокортикостероидов обуславливает актуальность поиска объективных критериев прогнозирования эффективности проводимой терапии. Авторами предложен метод определения популяции глюкокортикоидорезистентных лимфоцитов в периферической крови больных бронхиальной астмой, получающих ингаляционную глюкокортикостероидную терапию. Результаты исследования показали, что у больных бронхиальной астмой независимо от используемых доз ингаляционных глюкокортикостероидов эффективность проводимой терапии возможно оценить по степени подавления гормонами индуцированной антигеном домашней пыли пролиферации лимфоцитов *in vitro*. Полученные данные могут быть использованы в клинической практике для прогноза эффективности и корректирования терапии ингаляционными глюкокортикостероидами у больных бронхиальной астмой.

Ключевые слова: бронхиальная астма, ингаляционные глюкокортикостероиды, резистентность, пролиферация лимфоцитов.

Kalashnikova A.A., Bychkova N.V., Davydova N.I., Zhdanova M.V., Evloeva M.K., Novik G.A.

Адрес для переписки:

Бычкова Наталья Владимировна,
ФГУЗ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России,
НИЛ клеточного и гуморального иммунитета
194044, Санкт-Петербург,
ул. Академика Лебедева, 4/2.
Тел.: (812) 607-59-24.
Факс: (812) 541-88-05.
E-mail: BNV19692007@yandex.ru

IDENTIFICATION OF ANTIGEN-SPECIFIC HORMONE-RESISTANT BLOOD LYMPHOCYTES TO PREDICT EFFICIENCY OF GLUCOCORTICOID THERAPY IN BRONCHIAL ASTHMA

Abstract. At present time, the main therapeutic goal in bronchial asthma treatment is to achieve complete control of the disease. Appropriate medical evaluation involves a complex system of clinical criteria and functional parameters obtained by instrumental and laboratory techniques. Wide application of inhalatory

glucocorticosteroids (IGCS) in childhood bronchial asthma treatment, requirements for a long-term therapy, and common IGCS dose-escalation regimens determine an importance of searching novel objective criteria to predict efficiency of the therapy performed. In present work, we propose a method aimed to identify glucocorticosteroid-resistant lymphocytes in peripheral blood of the patients with bronchial asthma undergoing IGCS therapy. The results of this study have shown that clinical efficiency of such treatment of bronchial asthma patients, independently on the IGCS dosage, may be evaluated by the degree of steroid-induced suppression of *in vitro* lymphocyte proliferation caused by a domestic dust antigen. The data obtained may be used in clinical settings to predict efficiency of IGCS therapy and adjust treatment regimens in bronchial asthma patients. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 157-166)

Keywords: bronchial asthma, inhalatory glucocorticosteroids, resistance, lymphocyte proliferation.

Введение

Бронхиальная астма (БА) является наиболее распространенным заболеванием, которым страдает от 5 до 10% детского населения [14] и характеризуется тенденцией к увеличению частоты заболеваемости и утяжелению течения [1, 4, 6]. Принимая во внимание наличие хронического аллергического воспаления дыхательных путей у больных с персистирующей формой БА [2], ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС) являются препаратами первой линии в лечении данной патологии, т.к. оказывают иммуносупрессирующее действие на разные звенья иммунной системы, участвующие в воспалении [8, 14, 28].

Глюкокортикостероиды подавляют как пролиферативную, так и синтетическую функции Т-лимфоцитов [5, 13, 16, 24, 28]. Одним из механизмов супрессорного действия глюкокортикостероидов является стимуляция синтеза IL-10 Treg-лимфоцитами [17, 22].

У некоторых пациентов развивается стероидорезистентная бронхиальная астма – использование высоких доз глюкокортикостероидов не позволяет достичь удовлетворительного терапевтического эффекта. У таких пациентов пролиферация Т-клеток, стимулированная ФГА [16] в меньшей степени зависит от воздействия дексаметазона, чем у стероидчувствительных пациентов.

В настоящее время остается открытым вопрос об особенностях действия глюкокортикостероидов *in vitro* на антиген-стимулированную пролиферацию Т-клеток у стероидорезистентных пациентов по сравнению со стероидчувствительными. Ввиду того, что раннее выявление в периферической крови (ПК) антиген-специфических лимфоцитов, устойчивых к действию глюкокортикостероидов, может быть полезно для определения тактики лечения больных, находящихся на гормональной терапии, **целью нашего исследования** явилось изучение специфического пролиферативного ответа лимфоцитов стероидчувствительных и стероидорезистентных пациентов.

Возможность использования ПК больных БА для моделирования антиген-стимулированного

Т-клеточного ответа в бронхах была обоснована S.O. Till и соавторами [28], доказавшими, что пролиферативные ответы антиген-специфических Т-клеток ПК и бронхоальвеолярного лаважа статистически эквивалентны и находятся в прямой корреляции друг с другом.

Материалы и методы

Пациенты

Проведено иммунологическое обследование 46 пациентов с тяжелым течением бронхиальной астмы с сенсibilизацией к антигену домашней пыли, выявленной с помощью кожных проб.

Возраст пациентов колебался от 6 до 17 лет (средний возраст 14,3 года), среди них 32 мальчика и 14 девочек. Средняя продолжительность стероидной терапии составляла 5 лет.

В качестве группы сравнения были обследованы 8 детей со спокойным аллергологическим анамнезом. Эта группа по полу и возрасту была сопоставима с группой пациентов с БА.

В зависимости от используемых доз ингаляционных глюкокортикостероидов (средние и высокие) и клинической эффективности проводимой терапии вся когорта пациентов с БА была разделена на группы (табл. 1). Постулировали, что недостаточно эффективной является терапия, которая не позволяет контролировать течение заболевания, достаточно эффективной – та, которая приводит к стойкой фармакологической ремиссии БА.

Постановка культуры клеток периферической крови

В исследовании была оценена пролиферативная активность лимфоцитов периферической крови, стимулированная стандартным митогеном и специфическим антигеном домашней пыли. Возможность оценки пролиферативного ответа лимфоцитов в культурах цельной крови после стимуляции различными индукторами была обоснована Влоетена Е. с соавторами [10].

Кроме того, проводили оценку эффективности подавления пульмикортом неспецифической

ТАБЛИЦА 1. ГРУППЫ ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗЫ ИГКС И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОВОДИМОЙ ТЕРАПИИ

	Пациенты с недостаточно эффективной терапией	Пациенты с эффективной терапией	Всего
Высокие дозы ингаляционных глюкокортикостероидов	17	10	27
Средние дозы ингаляционных глюкокортикостероидов	5	14	19
Всего	22	24	46

Т-клеточной пролиферации и пролиферации антиген-специфических лимфоцитов.

Цельную гепаринизированную кровь (20 МЕ/мл) инкубировали в питательной среде RPMI 1640 с глутамином (0,3 мг/мл) (Биолот), гентамицином (0,08 мг/мл) (Микроген, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Биолот, Россия) с использованием полистироловых планшетов для иммуоферментного анализа (Медполимер, Россия) в стандартных условиях при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в присутствии и отсутствии индукторов пролиферации.

Спонтанная и индуцированная неспецифическая пролиферация

Спонтанную пролиферацию лимфоцитов – способность клеток к делению без стимуляции – определяли в культуре крови без добавления индукторов на 3-и (К3) и 7-е (К7) сутки инкубации.

Для оценки индуцированной пролиферации культивирование цельной крови проводили совместно с преимущественно Т-клеточным митогеном – фитогемагглютинином (Sigma, США) в течение 3 суток (ФГА).

Для учета спонтанной пролиферации в четыре лунки вносили 100 мкл RPMI-1640, для оценки индуцированной пролиферации в четыре лунки добавляли по 50 мкл RPMI-1640 и 50 мкл ФГА (15 мкг/мл), далее во все лунки вносили по 100 мкл разведенной 1:5 крови.

В половину лунок с ФГА добавляли пульмикорт (0,25 мг/мл, AstraZeneca AB, Швеция) в объеме 2 мкл (ФГА + П).

Антиген-специфическая пролиферация

Для оценки специфической пролиферации инкубацию цельной крови проводили совместно с антигеном домашней пыли («Аллерген из домашней пыли», Биомед, 10000 PNU/мл) в течение 7 суток (АГ). Для учета специфической пролиферации в четыре лунки вносили по 100 мкл RPMI-1640, 100 мкл разведенной 1:5 крови и 10 мкл антигена домашней пыли.

В половину лунок с антигеном домашней пыли добавляли пульмикорт (0,25 мг/мл, AstraZeneca AB, Швеция) в объеме 2 мкл (АГ + П).

Проточная цитометрия

Фенотипирование лимфоцитов

Имунофенотипирование клеток периферической крови осуществляли в многоцветном анализе методом проточной цитометрии (Cytomics FC500, Beckman-Coulter, США) с использованием моноклональных антител CD4FITC, CD127PE, CD25PC5 и соответствующих изотипических контролей (Beckman-Coulter, США) по безотмывочной технологии с применением для лизиса эритроцитов OptiLyse C (Beckman-Coulter, США). В лимфоцитарном гейте анализировали 5000 событий. Абсолютное количество Т-хелперов (CD4⁺) и Т-регуляторных лимфоцитов (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) определяли двухплатформенным способом.

ДНК-цитометрия

Для оценки пролиферации лимфоцитов после окончания инкубации аккуратно отбирали из лунок планшета надосадочную жидкость, клетки из лунки ресуспендировали в 200 мкл р-ра Версена (Биолот, Россия), после чего клеточную взвесь окрашивали для ДНК-цитометрии.

В пробирки, содержащие клеточную взвесь в объеме 400 мкл добавляли 14 мкл 1% водного раствора неионного детергента тритона X-100 (ICN Biomedicals, Германия), 10 мкл водного раствора интеркалятора этидиума бромида в концентрации 1 мг/мл (Sigma, Германия), 10 мкл 0,01% водного раствора мРНКазы (Sigma, Германия), содержащего 0,001% азида натрия (Sigma, Германия). Образцы инкубировали в течение 30 минут в темноте при 4 °С, после чего проба была готова к исследованию на проточном цитометре.

Учет пролиферации лимфоцитов осуществляли методом ДНК-цитометрии (EPICS XL, Beckman-Coulter, США). Анализ ДНК-гистограмм проводили с использованием программы MultiCycle AV ver. 3 (Phoenix Flow Systems, Beckman-Coulter). При анализе 5 тысяч событий в каждой пробе оценивали долю пролиферирующих клеток, находившихся в фазе синтеза ДНК, в фазе G₂ и митозе. При проведении исследования соблюдали правила регистрации, анализа и интерпретации ДНК-гистограмм [23, 26].

Уровень пролиферативной активности (индекс пролиферации) вычисляли как сумму клеток, находящихся в синтетической, постсинтетической фазах и в митозе и выражали в процентах. Индекс стимуляции на антиген домашней пыли (АГ/К7) рассчитывали как соотношение показателей антиген-стимулированной и спонтанной пролиферации лимфоцитов. Индекс АГ/К7 более 1 свидетельствовал о наличии пролиферативного ответа на антиген.

Для учета подавляющего действия пульмикорта вводили:

- индекс подавления ФГА-стимулированной пролиферации (ФГА + П/ФГА) – частное от деления процента клеток, пролиферирующих в ответ на ФГА в присутствии пульмикорта на процент клеток, пролиферирующих в ответ на ФГА. О супрессорном эффекте пульмикорта на ФГА-индуцированную пролиферацию свидетельствовал индекс менее 1;

- индекс подавления антиген-стимулированной пролиферации (АГ + П/АГ) – частное от деления процента клеток, пролиферирующих в ответ на антиген домашней пыли в присутствии пульмикорта на процент клеток, пролиферирующих в ответ на антиген домашней пыли. О супрессорном эффекте пульмикорта на антиген-индуцированную пролиферацию свидетельствовал индекс менее 1.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ “STATISTICA” (версия 5.0). Все данные были представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Для выявления статистически достоверных отличий между группами был использован непараметрический U-тест Манна-Уитни.

Результаты

Количество лимфоцитов, субпопуляций Т-хелперов и Т-регуляторных клеток

По относительному и абсолютному количеству лимфоцитов, содержанию Т-хелперов и Т-регуляторных клеток больные с БА и лица группы сравнения были сопоставимы (данные не представлены).

В группе больных БА с эффективной терапией наблюдалось более низкое абсолютное и относительное количество лимфоцитов ($p < 0,05$), абсолютное количество Т-хелперов ($p < 0,05$) и Treg (отличия недостоверны) по сравнению с группой с неэффективной терапией (рис. 1).

У пациентов, получавших средние дозы ИГКС, выявлено снижение абсолютного количества лимфоцитов по сравнению с группой больных, получавших высокие дозы ИГКС ($1641 \pm 692,1$ против $2060 \pm 807,9$; $p < 0,05$), поэтому абсолютное количество Т-хелперов и Т регуляторных лимфоцитов в первой группе было достоверно ниже, чем во второй (648 ± 65 против $910 \pm 74,5$; и $51,0 \pm 8,72$ против $80,6 \pm 11,53$ соответственно; $p < 0,05$) при сопоставимом относительном количестве субпопуляций лимфоцитов.

Сравнение результатов пациентов в зависимости от используемых доз ИГКС и эффективности терапии показало тенденцию к снижению абсолютного числа лимфоцитов и их субпопуляций в подгруппах с эффективной терапией, которая

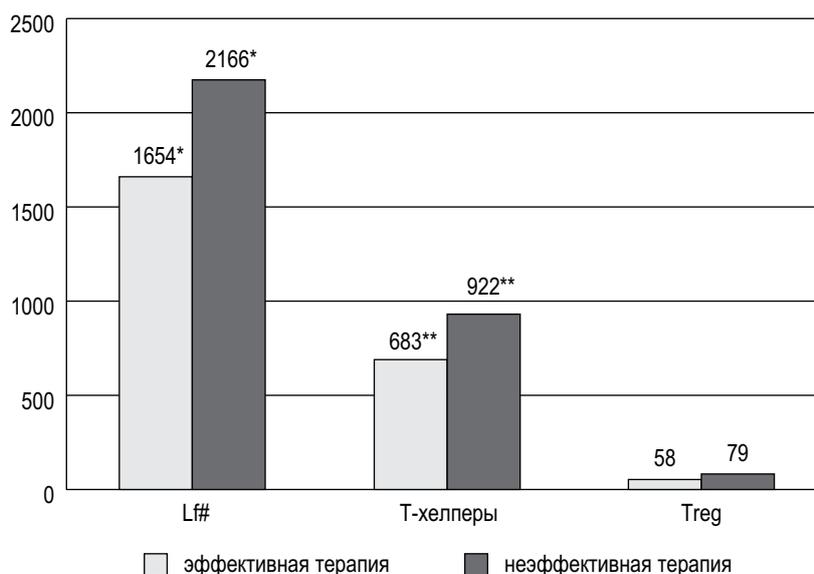


Рисунок 1. Сравнение значений абсолютного числа лимфоцитов периферической крови, Т-хелперов и Т-регуляторных лимфоцитов у пациентов с БА в зависимости от эффективности терапии

Примечание. *, ** – $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 2. АБСОЛЮТНОЕ И ОТНОСИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЛИМФОЦИТОВ И СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ХЕЛПЕРОВ И Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК В ГРУППАХ ПАЦИЕНТОВ С БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗ ИГКС И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

	Высокие дозы ИГКС, n = 27		Средние дозы ИГКС, n = 19	
	Недостаточно эффективная терапия, n = 17	Эффективная терапия, n = 10	Недостаточно эффективная терапия, n = 5	Эффективная терапия, n = 14
Lf#	2231*±870	1662*±558	1944±707	1647±665
Lf%	33,3±8,6	29,7±9,0	28,3±4,0	23,5±8,1
CD4#	982±105,7	774±91,5	720±132,2	667,9±83,7
CD4%	44,2±7,43	46,4±6,59	41,0±8,83	40,7±7,99
Treg#	88±15,5	70±18,9	56±11,1	45±15,3
Treg%	7,87±2,4	7,14±1,49	7,78±1,06	7,30±3,18

Примечание. Lf# – абсолютное количество лимфоцитов; Lf% – относительное количество лимфоцитов; CD4# – абсолютное количество Т-хелперов; CD4% – относительное количество Т-хелперов; Treg# – абсолютное количество Т-регуляторных клеток; Treg% – относительное количество Т-регуляторных клеток. * – $p < 0,05$.

у пациентов, принимавших высокие дозы ИГКС, приобретала достоверный характер (табл. 2).

Вероятно, эффективность гормональной терапии обусловлена в том числе снижением абсолютного количества лимфоцитов.

Влияние пульмикорта на неспецифическую пролиферацию лимфоцитов периферической крови

У пациентов с БА спонтанная 3-х суточная пролиферация лимфоцитов была выше, чем в группе сравнения, а пролиферативный ответ на ФГА – ниже (табл. 3). У пациентов с БА супрессорный эффект пульмикорта на ФГА-стимулированный пролиферативный ответ Т-лимфоцитов был достоверно слабее – индекс ФГА + П/ФГА у больных вдвое выше, чем у лиц со спокойным аллергоанамнезом, что свидетельствует о снижении

чувствительности лимфоцитов пациентов, находящихся на длительной гормональной терапии, к дополнительному воздействию пульмикорта.

В группах больных БА с эффективной и неэффективной терапией спонтанная пролиферация лимфоцитов ($0,41 \pm 0,12$ против $0,42 \pm 0,09$), ответ на ФГА ($29,8 \pm 9,7$ против $24,2 \pm 10,1$) и индекс подавления пульмикортом ФГА-стимулированной пролиферации ($0,25 \pm 0,12$ и $0,22 \pm 0,14$) были сопоставимы.

В группах больных БА, получавших высокие и средние дозы ИГКС, были отмечены схожие результаты: спонтанная пролиферация лимфоцитов ($0,44 \pm 0,13$ против $0,40 \pm 0,07$), ответ на ФГА ($24,05 \pm 10,7$ против $29,0 \pm 10,9$) и индекс подавления

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ПУЛЬМИКОРТА НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ БА И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

	Больные БА, n = 46	Группа сравнения, n = 8
Спонтанная пролиферация 3-суточная (КЗ), % пролиферирующих клеток	$0,42^* \pm 0,16$	$0,31^* \pm 0,04$
Пролиферация, стимулированная ФГА, (ФГА), % пролиферирующих клеток	$26,08^{**} \pm 12,76$	$42,69^{**} \pm 4,58$
Пролиферация, стимулированная ФГА в присутствии пульмикорта (ФГА + П), % пролиферирующих клеток	$7,15 \pm 8,9$	$3,88 \pm 4,49$
Индекс подавления пульмикортом пролиферации на ФГА (ФГА + П/ФГА)	$0,22^{***} \pm 0,22$	$0,1^{***} \pm 0,12$

Примечание. ФГА – фитогемагглютинин. *, **, *** – $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ПУЛЬМИКОРТА НА НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДОЗ ИГКС И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

	Высокие дозы ИГКС, n = 27		Средние дозы ИГКС, n = 19	
	Недостаточно эффективная терапия, n = 17	Эффективная терапия, n = 10	Недостаточно эффективная терапия, n = 5	Эффективная терапия, n = 14
Спонтанная пролиферация 3-суточная (КЗ), % пролиферирующих клеток	0,44±0,05	0,42±0,08	0,36±0,04	0,4±0,04
Пролиферация, стимулированная ФГА (ФГА), % пролиферирующих клеток	23,2±3,2	27,5±3,8	27,7±6,7	31,5±3,5
Индекс подавления пульмикортом пролиферации на ФГА (ФГА + П/ФГА)	0,2±0,04	0,19±0,08	0,29±0,14	0,3±0,07

Примечание. ФГА – фитогемагглютинин.

ния пульмикортом ФГА-стимулированной пролиферации ($0,19 \pm 0,14$ и $0,30 \pm 0,21$).

При сравнении данных по неспецифической пролиферации у пациентов в зависимости от используемых доз ИГКС и эффективности терапии наблюдалась тенденция увеличения пролиферации в ответ на ФГА при эффективной терапии независимо от дозы ИГКС (табл. 4). При этом пульмикорт сходно действовал на ФГА-стимулированную пролиферацию независимо от используемых доз ИГКС и эффективности терапии: индекс ФГА + П/ФГА сопоставим во всех группах (табл. 4).

Таким образом, влияние пульмикорта на ФГА-индуцированную пролиферативную активность лимфоцитов периферической крови лиц группы сравнения значительно более выражено, чем у пациентов, получающих стероидную терапию. При этом супрессорный эффект пульмикорта у больных БА не зависел от получаемой дозы ИГКС и эффективности проводимой терапии.

Влияние пульмикорта на специфическую пролиферацию лимфоцитов периферической крови

Спонтанная пролиферация в 7-ми суточной культуре в группе больных БА была несколько выше, чем у детей со спокойным аллергоанамнезом (табл. 5) и сопоставима с таковой в 3-х суточной культуре. В группе сравнения в ответ на антигенную стимуляцию была выявлена пролиферация лимфоцитов, сравнимая с таковой у пациентов с БА (индекс АГ/К > 1). Однако у последних пульмикорт сильнее влиял на специфическую пролиферацию, что подтверждалось более высоким индексом подавления пульмикортом пролиферации на антиген домашней пыли (табл. 5).

В группах больных БА с различной эффективностью терапии наблюдалась сходная как спонтанная, так и специфическая пролиферация лимфоцитов. В то же время у больных с отсутствием полного контроля заболевания не выявлено супрессии специфического пролиферативно-

ТАБЛИЦА 5. ВЛИЯНИЕ ПУЛЬМИКОРТА НА АНТИГЕН-СТИМУЛИРОВАННУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ БА И ГРУППЫ СРАВНЕНИЯ

	Больные БА, n = 46	Группа сравнения, n = 8
Спонтанная пролиферация 7-суточная (К7), % пролиферирующих клеток	0,38±0,13	0,29±0,15
Индекс стимуляции на антиген домашней пыли (АГ/К)	1,3±0,64	1,45±0,62
Индекс подавления пульмикортом пролиферации на антиген домашней пыли (АГ + П/АГ)	0,91*±0,47	0,61*±0,19

Примечание. * – $p < 0,05$.

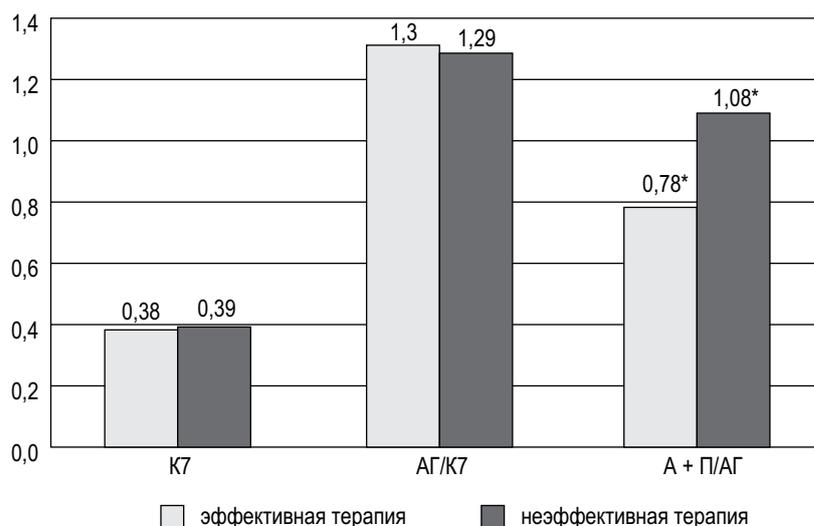


Рисунок 2. Пролiferация лимфоцитов, стимулированная антигеном домашней пыли в группах больных БА с различной эффективностью проводимой терапии

Примечание. К7 – спонтанная 7-суточная пролиферация лимфоцитов (% пролиферирующих клеток); АГ/К7 – индекс пролиферации лимфоцитов в ответ на введение антигена домашней пыли; АГ + П/АГ – индекс подавления пульмикортом антиген-стимулированной пролиферации. * – $p < 0,05$.

го ответа в отличие от пациентов другой группы (рис. 2).

У пациентов, получавших высокие дозы ИГКС спонтанная пролиферация лимфоцитов на 7-е сутки была достоверно выше, чем у больных, получавших средние дозы ($0,43 \pm 0,024$ и $0,30 \pm 0,03$ соответственно, $p < 0,05$). В группах пациентов, получавших высокие и средние дозы ИГКС пролиферативный ответ лимфоцитов на антиген домашней пыли ($1,20 \pm 0,35$ и $1,40 \pm 0,68$) и индекс подавления специфической пролиферации пульмикортом ($0,89 \pm 0,32$ и $0,90 \pm 0,55$) практически не различались.

При сравнении данных по специфической пролиферации у пациентов в зависимости от используемых доз ИГКС и эффективности терапии было выявлено, что спонтанная и антиген-специфическая пролиферация лимфоцитов были сопоставимы в разных группах (табл. 6). Со-

вместное культивирование лимфоцитов с антигеном домашней пыли и пульмикортом показало, что у пациентов с эффективной терапией при корректном подборе дозы ИГКС наблюдали значительную супрессию специфической пролиферации (индексы подавления пульмикортом специфической пролиферации 0,77 и 0,79) (табл. 6). При недостаточно эффективной терапии с применением как высоких, так и средних доз ИГКС, супрессии пролиферации специфических лимфоцитов практически не наблюдалась (индексы подавления пульмикортом специфической пролиферации близки к 1 – 0,97 и 1,16) (табл. 6).

Таким образом, предложенная методика позволяет выявлять антиген-специфические лимфоциты и их чувствительность к действию ИГКС *in vitro*, то есть выявлять наличие в ПК антиген-специфических глюкокортикоидорезистентных лимфоцитов.

ТАБЛИЦА 6. ВЛИЯНИЕ ПУЛЬМИКОРТА НА АНТИГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКУЮ ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ БОЛЬНЫХ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДОЗ ИГКС И ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ

	Высокие дозы ИГКС, n = 27		Средние дозы ИГКС, n = 19	
	Недостаточно эффективная терапия, n = 17	Эффективная терапия, n = 10	Недостаточно эффективная терапия, n = 5	Эффективная терапия, n = 14
Спонтанная пролиферация 7-суточная (К7), % пролиферирующих клеток	$0,42 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,08$	$0,34 \pm 0,03$
Индекс стимуляции на антиген из домашней пыли (АГ/К)	$1,3 \pm 0,11$	$1,1 \pm 0,16$	$1,3 \pm 0,33$	$1,5 \pm 0,26$
Индекс подавления пульмикортом пролиферации на АГ (АГ + П/АГ)	$0,97^* \pm 0,08$	$0,77^* \pm 0,16$	$1,16^{**} \pm 0,35$	$0,79^{**} \pm 0,1$

Примечание. *, ** – $p < 0,05$.

Обсуждение

Активация лимфоцитов под воздействием ФГА послужила в 1960 году толчком для разработки РБТЛ – реакции бласттрансформации лимфоцитов [3]. РБТЛ основана на способности сенсibilизированных лимфоцитов трансформироваться в культуре под действием неспецифических митогенов или специфических антигенов в малодифференцированные клетки типа бластов, способных к пролиферации. Классическим методом для оценки пролиферативной активности лимфоцитов является вариант, основанный на включении в ДНК меченого тимидина [25]. Использование метода проточной цитометрии позволяет оценить клеточную кинетику посредством измерения содержания ДНК в окрашенных ядрах лимфоцитов после культивирования. Проточная цитометрия обеспечивает определение статического распределения внутриклеточного содержания ДНК, а тимидиновая инкорпорация – скорость синтеза внутриклеточной ДНК, но при этом доказана корреляция между данными, полученными этими двумя методами, в оценке пролиферации лимфоцитов [12].

Возможность использования проточной ДНК-цитометрии для оценки митоген-стимулированной пролиферации как альтернативы традиционного радиоактивного теста была обоснована рядом работ зарубежных исследователей [7, 11, 19]. Результаты исследований свидетельствуют о том, что ввиду высокой воспроизводимости, точности, чувствительности, скорости анализа, безопасности и относительной простоты оценка пролиферации лимфоцитов методом ДНК-цитометрии может быть более предпочтительной для лабораторной практики по сравнению с тестом, где используется радиоактивная метка.

Нами предложена методика, позволяющая выявлять антиген-специфические лимфоциты периферической крови больных БА с пониженной чувствительностью к действию глюкокортикоидов, используя пролиферативный тест с оценкой результатов методом проточной ДНК-цитометрии.

Результаты нашей работы свидетельствуют о возможности коррекции дальнейшей терапии больных БА с использованием ИГКС на основании выявления стероидрезистентных антиген-специфических лимфоцитов *in vitro*.

Нами выявлено, что при проведении терапии ИГКС, независимо от используемых доз глюкокортикостероидов, ее высокая эффективность связана со снижением абсолютного количества лимфоцитов и соответственного снижения абсолютного количества Т-хелперов. При этом мы не выявили достоверных изменений в отно-

сительном количестве Т-хелперов и Трег клеток у пациентов, принимавших разные дозы ИГКС с различными эффектами терапии. Наши результаты об отсутствии изменений относительного числа Трег клеток совпадают с результатами ряда исследователей [9, 15, 27]. Кроме того, среди зарубежных работ встречаются сообщения как об их снижении по сравнению со здоровыми детьми [21, 22], так и о динамике на фоне терапии с различной тяжестью заболевания [18, 20, 21, 27]. Тем не менее, все исследователи отмечали снижение продукции IL-10 Трег клетками у пациентов с БА, которая восстанавливается при эффективной терапии ИГКС.

Наши результаты о значительном подавлении пульмикортом *in vitro* ФГА-стимулированной пролиферации лимфоцитов больных бронхиальной астмой совпадают с результатами ранее проведенных исследований [16]. Эффект пульмикорта на неспецифическую пролиферацию выражен в сходной степени во всех группах больных БА независимо от используемой дозы ИГКС и эффективности терапии. Заслуживает внимания факт, что, несмотря на значимо более высокую ФГА-стимулированную пролиферацию лимфоцитов в группе сравнения, супрессорный эффект пульмикорта на неспецифическую пролиферацию лимфоцитов больных бронхиальной астмой значительно менее выражен, чем у детей со спокойным аллергологическим анамнезом.

Отмеченная нами у всех обследованных детей пролиферация лимфоцитов в ответ на введение в культуру антигена домашней пыли свидетельствует о присутствии в периферической крови антиген-специфических лимфоцитов и у пациентов с БА и у детей со спокойным аллергоанамнезом. Возможно, это обусловлено особенностями данного антигена. Известно, что домашняя пыль является, во-первых, сильным и повсеместно распространенным аллергеном, поэтому практически каждый человек постоянно с ней сталкивается, во-вторых, ингаляционным аллергеном, а значит, она непосредственно взаимодействует с организмом в дыхательных путях, в-третьих, состоит из набора разнообразных белковых структур, что позволяет более широкому спектру антиген-специфических лимфоцитов принимать участие в их распознавании. Вероятно, у аллергически некомпromетированных детей собственные регуляторные механизмы способствуют подавлению активности клеток аллергического ответа. В культуральных исследованиях при использовании пульмикорта в этой группе детей отмечено значительное подавление антиген-стимулированной пролиферации, тогда как у больных БА этот эффект выражен слабее, как и в случае неспецифической пролиферации.

В исследовании А. Насзку с соавторами [16] отмечено, что для сходного супрессорного эффекта глюкокортикоидов на антиген-стимулированные *in vitro* клетки больных БА по сравнению с донорскими, требуется использование большей дозы глюкокортикоидов. В нашей работе значительный супрессорный эффект пульмикорта на антиген-специфическую пролиферацию клеток ПК *in vitro* отмечали только у пациентов с высокой эффективностью терапии ИГКС независимо от используемых в терапии БА доз препаратов. Выявленное нами у ряда пациентов слабовыраженное или отсутствующее супрессорное действие пульмикорта на антиген-специфическую пролиферацию связано, по-видимому, с присутствием в ПК антиген-специфических лимфоцитов, резистентных к действию глюкокортикоидов, что обуславливает низкую эффективность проводимой терапии.

Таким образом, разработанная нами методика оценки пролиферативной активности лимфоцитов со специфическим антигеном в присутствии пульмикорта может применяться для выявления глюкокортикоидорезистентных лимфоцитов.

Данные по подавлению стероидами специфической пролиферации лимфоцитов *in vitro* могут быть использованы в клинической практике для прогнозирования эффективности применения ИГКС или коррекции терапии у больных бронхиальной астмой.

Заключение

Спонтанная пролиферация лимфоцитов пациентов с бронхиальной астмой выше, а митоген-стимулированная — ниже, чем у детей со спокойным аллергоанамнезом, однако пролиферативный ответ на специфический антиген домашней пыли *in vitro* имеет место не только у пациентов с бронхиальной астмой, но и у детей со спокойным аллергоанамнезом. Супрессорный эффект пульмикорта на специфическую и неспецифическую пролиферацию лимфоцитов *in vitro* значительно менее выражен у пациентов с бронхиальной астмой по сравнению с лицами со спокойным аллергоанамнезом. У пациентов с полным контролем заболевания бронхиальной астмой при корректно подобранной дозе используемых гормональных препаратов наблюдается значительный эффект подавления пульмикортом специфической пролиферации лимфоцитов *in vitro*.

Вывод

Предложенная методика оценки пролиферативной активности лимфоцитов со специфическим антигеном в присутствии пульмикорта позволяет выявлять наличие антиген-специфических

лимфоцитов и их чувствительность к действию ИГКС *in vitro* для прогнозирования эффективности использования ИГКС или коррекции терапии у больных бронхиальной астмой.

Список литературы

1. Баранов А.А., Балаболкин И.И., Боровик Т.Э. Детская аллергология: руководство для врачей. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 688 с.
2. Воробьев А.А., Быков А.С., Караулов А.В. Иммунология и аллергология. — М.: Практическая медицина. — 2006. — 282 с.
3. Найт С. Анализ пролиферации лимфоцитов // Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. — М.: Мир, 1990. — С. 286-310
4. Федосеев Г.Б., Трофимов В.И. Бронхиальная астма. — СПб.: Нордмедиздат, 2006. — 308 с.
5. Adcock I.M., Barnes P.J. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance // Chest. — 2008. — Vol. 134, N 2. — P. 394-401.
6. Anandan C., Nurmatov U., van Schayck O.C.P., Sheikh A. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies // Allergy. — 2010. — Vol. 65. — P. 152-167.
7. Azzolina L.S., Stevanoni G., Tridente G. DNA analysis of stimulated lymphocytes by automatic sampling for flow cytometry // Cytometry. — 1988. — Vol. 9. — P. 508-511.
8. Barnes P.J., Chung K.F., Page C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update // Pharmacol. Rev. — 1998. — Vol. 50, N 4. — P. 515-596.
9. Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress TH1 and TH2 cytokine production // J. Allergy Clin Immunol. — 2003. — Vol. 111. — P. 862-868.
10. Bloemena E., Roos M.T., Van Heijst J.L., Vossen J.M., Schellekens P.T. Whole-blood lymphocyte cultures // J. Immunol. Methods. — 1989. — Vol. 122, N 2. — P. 161-167.
11. Bussa S., Rumi C., Leone G., Bizzi B. Evaluation of a new whole blood cytometric lymphocyte transformation test for immunological screening // J. Clin. Lab. Immunol. — 1993. — Vol. 40. — P. 39-46.
12. Crissman H.A., Steincamp J.A. Multivariate cell analysis: Techniques for correlated measurements of DNA and other cellular constituents // Techniques in cell cycle analysis. — Clifton, New-Jersey: Humana Press, Inc., 1987. — P. 163-206.
13. Du J., Li M., Zhang D., Zhu X., Zhang W., Gi W., Feng Y., Zhai X., Ling Ch. Flow cytometry analysis of glucocorticoid receptor expression and binding in steroid-sensitive and steroid-resistant patients with systemic lupus erythematosus // Arthritis Res. Ther. — 2009. — Vol. 11, N 4. — P. 108-116.

14. Global Initiative for Asthma.-NHLB/WHO Workshop Report. – National Heart Lung Blood Institute, 2009. – 112 P.
15. Grindebacke H., Wing K., Andersson A.-C., Suri-Payer E., Rak S., Rudin A. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season // Clin. Exp. Allergy. – 2004. – Vol. 34. – P. 1364-1372.
16. Haczku A., Alexander A., Brown P., Assoufi B., Li B., Kay A.B. and Corrigan C. The effect of dexamethasone, cyclosporine, and rapamycin on T-lymphocyte proliferation in vitro: Comparison of cells from patients with glucocorticoid-sensitive and glucocorticoid-resistant chronic asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 1994. – Vol. 93. – P. 510-519.
17. John M., Lim S., Seybold J., Jose P., Robichaud A., O'Connor B., Barnes P.J., Chung K.F. Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1a, granulocyte-macrophage stimulating factor and interferon-g release from alveolar macrophages in asthma // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1998. – Vol. 157. – P. 256-262.
18. Karagiannidis C, Akdis M, Holopainen P. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma // J. Allergy Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 114. – P. 1425-1433.
19. Kohler Ch., Kolopp-Sarda M.N., De March-Kennel A. Sequential assessment of cell cycle S phase in flow cytometry: a non-isotopic method to measure lymphocyte activation in vitro // Analytical Cellular Pathology – 1997. – Vol. 14. – P. 51-59.
20. Lee J.-H., Yu H.-H., Wang L.-C., Lin Y.-T., Chiang B.-L. The levels of CD4+CD25+ regulatory T cells in paediatric patients with allergic rhinitis and bronchial asthma // Clin. Exp. Immunol. – 2007. – Vol. 148, N 1. – P. 53-63.
21. Li M., Song L., Zhang J.B., Fang J., Li L. Changes of CD4+CD25+ regulatory T cells, IL-10 and TGF-beta 1 levels in peripheral blood in children with asthma // Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. – 2009. – Vol. 11, N 10. – P. 829-832.
22. Moore K.W., de Waal Malefyt R., Coffman R.L., O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor // Annu Rev. Immunol. – 2001. – Vol. 19. – P. 683-765.
23. Ormerod M.G., Tribukait B., Giaretti W. Consensus report of the task force on standardization of DNA flow cytometry in clinical pathology // Anal. Cell Pathol. – 1998. – Vol. 17, N 2. – P. 103-110.
24. Peek E.J., Richards D.F., Faith A., Lavender P. Interleukin-10-Secreting "regulatory" T cells induced by glucocorticoids and β 2-agonists. // Am. J. Respir. Cell and Molecular biology. – 2005. – Vol. 33. – P.105-111.
25. Report of the committee on clinical immunology of the IUIS // Eur. J. Immunol. – 1976. – Vol. 6. – P. 231-234.
26. Shankey T.V., Rabinovitch P.S., Bagwell B., Bauer K.D., Duque R.E., Hedley D.W., Mayall B.H., Wheelless L. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry // Cytometry – 1993. – Vol. 14. – P. 472-477.
27. Shi H.Z., Li S., Xie Z.F., Oin X.J., Oin X., Zhong X.N. Regulatory CD4+CD25+ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma // Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 113. – P. 172-178.
28. Till S.J., Durham S.R., Rajakulasingam K. Allergen-induced proliferation and interleukin-5 production by bronchoalveolar lavage and blood T cells after segmental allergen challenge // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 1998. – Vol. 158, N 2. – P. 404-411.

поступила в редакцию 24.01.2011
принята к печати 14.02.2011