

УДК 616.154.95

Диагностика состояния общего и местного гуморального иммунитета у больных поллинозом при сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии

М.В. Манжос¹, Е.С. Феденко², М.А. Мягкова³, Б.А. Молотиллов⁴, С.А. Шкадов¹, С.Н. Петроченко³, Р.Ю. Киселева³

¹Городская клиническая больница №4, Пенза

²ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва

³Институт физиологически активных веществ РАН, Москва

⁴ГОУ ДПО Институт усовершенствования врачей, Пенза

Diagnostics of condition of the general and local humoral immunity of pollinosis patients at sublingual allergen-specific immunotherapy.

M.V. Manzhos¹, E.S. Fedenko², M.A. Myagkova³, B.A. Molotilov⁴, S.A. Shkadov¹, S.N. Petrochenko³, R.Y. Kiseleva³

¹Gorodskaya City clinical hospital № 4, Penza

²SNC Institute of immunology FMBA of Russia, Moscow

³Institute physiologically active substances of the Russian Academy of Science, Moscow

⁴Institute of Doctors' Qualification Improvement, Penza

Аннотация

Изучение влияния сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии (сЛАСИТ) на состояние общего и местного гуморального иммунитета у больных поллинозом.

В исследование включены 40 практически здоровых лиц и 50 больных поллинозом, которым проведено лечение аллергеном "Осенняя смесь трав". Больные I группы (25 пациентов) получили курсовую дозу 60394 PNU, больные II группы (25 пациентов) – 3915 PNU. Исследованы некоторые показатели местного и общего иммунитета. АСИТ изменяет профиль цитокинов в сторону Th-1, стимулирует образование секреторных аллерген-специфических IgA-антител, снижает содержание IgE-антител в слюне. Более выраженные изменения IgA, IgE-антител и АТ к гистамину выявлены в I группе.

АСИТ способна индуцировать В-клеточную и Т-клеточную толерантность. Назначение высоких доз пероральных аллергенов у взрослых пациентов является более предпочтительным.

АСИТ способна индуцировать В-клеточную и Т-клеточную толерантность. Назначение высоких доз пероральных аллергенов у взрослых пациентов является более предпочтительным.

Ключевые слова

Сублингвальная аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), поллиноз, иммунитет

Summary

To study an influence of sublingual allergen-specific immunotherapy (sLASIT) on a condition of the general and local humoral immunity of pollinosis patients.

40 practically healthy persons and 50 pollinosis patients who received treatment by allergen « An autumn mix of grasses » were included in the investigation. Patients of the 1st group (25 patients) received a course doze 60394 PNU, patients of the 2nd group (25 patients) - 3915 PNU. Some parameters of local and general immunity were investigated.

sLASIT changed a profile of cytokines aside Th-1, stimulated formation secretory allergen-specific IgA-antibodies, reduced the maintenance of IgE-antibodies in a saliva. More obvious changes IgA, IgE-antibodies and AT to histamine were revealed in the 1st group.

sLASIT is capable to induce B-cellular and T-cellular tolerance.

Key words

Sublingual allergen-specific immunotherapy (sLASIT), pollinosis, immunity.

Аллерген-специфическая иммунотерапия является эффективным методом лечения аллергических заболеваний. Воздействуя на все звенья патогенеза аллергического процесса, она предупреждает его обострение и позволяет добиваться устойчивой клинической ремиссии [1]. В настоящее время большой интерес клиницистов представляет сублингвальная аллерген-специфическая иммунотерапия (сЛАСИТ), которая наряду со значительным снижением симптомов аллергического ринита и бронхиальной астмы, отличается высоким профилем безопасности и простотой применения [2, 3].

Одним из механизмов сЛАСИТ является индукция специфических иммуноглобулинов в секретах, которая способствует усилению фагоцитарного ответа, повышению барьерной функции и интерпретируется как местный гуморальный ответ слизистых оболочек [4, 5]. Сублингвальная иммунотерапия стимулирует выброс цитокинов (ИЛ-12, ИЛ-10, ИНФ- γ , ТФР- β), изменяет соотношения клеточных субпопуляций в сторону Th-1 клеток, угнетает пролиферацию Т-лимфоцитов, вызванную аллергеном, повышает число аллерген-специфических CD8⁺-Т-лимфоцитов, приводит к нормализации иммунорегуляторного индекса - соотношения CD4/CD8 лимфоцитов [6, 7, 8].

Несмотря на значительное количество исследований, посвященных сЛАСИТ, вопросы об иммунологических механизмах данного метода лечения остаются дискуссионными [9].

Целью работы явилось изучение влияния сЛАСИТ на состояние общего и местного гуморального иммунитета у больных поллинозом.

Материалы и методы

Обследовано 54 пациента в возрасте от 19 до 50 лет (29 мужчин, 25 женщин) страдающих поллинозом. Длительность заболевания, согласно данным анамнеза, составила $5,2 \pm 1,2$ года. Клинические проявления поллиноза были сочетанными и характеризовались чаще всего риноконъюнктивальным синдромом (85%). Явления бронхоспазма отмечены у 35% больных. Для сравнения данных обследовано 40 здоровых лиц того же возраста.

Специфическую иммунотерапию проводили в предсезонный период стандартизированным аллергеном «Осенняя смесь трав» для перорального применения («Севафарма», Чехия). Пациенты, включенные в исследование, методом случайного отбора были разделены на две группы. Больные I группы (13 мужчин, 12 женщин) по-

лучали аллерген до поддерживающей дозы в разведении 10000 PNU (не более 10 капель). Курсовая доза вводимого аллергена в течение всего периода лечения составила 60394 PNU. Пациенты II группы (13 мужчин, 12 женщин) получали аллерген до поддерживающей дозы в разведении 1000 PNU (не более 5 капель). Суммарная доза вводимого аллергена в течение всего периода лечения составила 3915 PNU.

Иммунологическое обследование проведено до начала лечения и через 6, 12 месяцев с момента проведения сЛАСИТ. Исследовали сыворотку и секрет ротовой полости (слюну); собранные образцы сохраняли при -20°C до момента исследования. У всех обследованных лиц в сыворотке крови были изучены концентрации общего IgE и аллерген-специфических IgA, IgM, IgG, IgE-антител, а также уровень ИНФ- γ и ИЛ-4, антитела (АТ) к гистамину, серотонину, брадикинину, вазопрессину. В секрете ротовой полости определяли содержание sIgA, аллерген-специфических IgA, IgM, IgG, IgE – антител и альбумина.

Для выявления антител в слюне человека против аллергена, содержащегося в препарате «Осенняя смесь трав» (Amb a 1), использовали способ с оптимальными условиями проведения анализа, описанный ранее [10]. Оценку получаемых результатов, проводили на основании критериев, выбранных нами в разработанных вариантах ИФА [11]. Количественное содержание IgA, IgM, IgG-антител слюны определяли по стандарту с известным содержанием иммуноглобулинов и выражали в микрограммах в мл (мкг/мл). Изменение значений оптической плотности для каждого обследованного пациента сравнивали с результатами калибровочной пробы со стандартным содержанием белка. Уровень IgE-антител в слюне определяли по сывороточному стандарту, откалиброванному по стандарту ВОЗ, и выражали в МЕ/мл. Концентрацию sIgA (мкг/мл) определяли общепринятым методом с использованием коммерческих наборов реагентов фирмы «Прогрессивные Био-Медицинские технологии» (Россия).

Содержание общего иммуноглобулина Е (IgE, МЕ/мл) в сыворотке крови определяли методом ИФА, используя наборы реагентов фирмы «Хема» (Россия). Концентрацию цитокинов (ИНФ- γ и ИЛ-4, пг/мл) в сыворотке периферической крови оценивали методом твердофазного ИФА коммерческими тест-системами фирмы «Вектор-БЕСТ» (Россия). Содержание альбумина (мг/мл) определяли методом Бредфорда (набор реагентов фирмы Sigma), для расчета кон-

центрации использовали калибровочную кривую, построенную с помощью стандартных растворов белка.

Конъюгированные антигены эндогенных биорегуляторов (брадикинина, вазопрессина, гистамина, серотонина) синтезировали на полимерном носителе по методу, описанному ранее [12].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием общепринятых методов вариационной статистики. Исследованные параметры представлены в виде медианы Me (LQ ; UQ), с интерквартильным размахом [25%-75%]. Достоверность различий в группах оценивали непараметрическими методами. Для сравнения показателей между группами применяли U критерий Манна-Уитни, при сравнении показателей внутри групп – критерий Вилкоксона, вычисляли доверительный интервал для медианы. Различия сравниваемых показателей принимали за достоверные результаты при $p < 0,05$. Полученные данные обрабатывали с применением статистических формул программы Microsoft Excel версия 5.0.

Результаты и обсуждение

Исследование закончили 50 пациентов. В период ремиссии у всех больных поллинозом выявлено снижение $sIgA$ в 2,6 раза. Значение $sIgA$ у больных составило 80 мкг/мл (60; 80), а у доноров - 200 мкг/мл (185; 210). У большинства (89,7%) пациентов в секрете ротовой полости отмечен дефицит аллерген-специфических IgA -антител, который равен 22 мкг/мл (14; 23) по сравнению с донорами, у которых эта величина равнялась 31 мкг/мл (24; 36); повышение уровня IgE -антител до 21,5 (19; 22,8) МЕ/мл у больных по сравнению с 14,3 (7; 15,5) МЕ/мл у доноров. Содержание IgM и IgG -антител в секрете ротовой полости у больных поллинозом выявлялось в виде следов. При исследовании сыворотки крови у всех пациентов выявлено повышение уровня общего IgE до 163 (120; 185) МЕ/мл, а у 81,5% больных также и реактивных IgE -антител до 16,1 (13,5; 19,0) по сравнению с 12,5 (6,4; 13,0) МЕ/мл у доноров.

Изучение цитокинового профиля показало достоверное повышение содержания ИНФ- γ (в 1,4 раза) - до 32 (32; 33) пг/мл и ИЛ-4 (в 3,3 раза) - до 65 (60; 70) пг/мл. Уровень медиаторов воспаления (гистамин, серотонин, вазопрессин, брадикинин) у больных поллинозом в период ремиссии был ниже, чем у здоровых доноров в 1,2-1,7 раза. Полученные результа-

ты указывают на нарушение функционирования как местного, так и общего иммунитета, преобладание Th -2 иммунного реагирования у больных поллинозом и согласуются с данными других авторов [1, 4].

Результаты обследования больных, получавших лечение разными дозами пероральных аллергенов, через 12 месяцев после слАСИТ представлены в таблице 1.

Положительная динамика иммунологических показателей отмечена у больных как I, так и II группы. В процессе слАСИТ в слюне выявлено повышение концентрации $sIgA$ в 1,2 раза, аллерген-специфических IgA -антител, достоверное снижение содержания IgE -антител. Изменения уровня общих и аллерген-специфических IgE -антител в сыворотке крови не отмечено.

Динамика аллерген-специфических IgA -антител в процессе слАСИТ имеет свои особенности. Через 6 месяцев от начала лечения у всех больных I группы, выявлено повышение содержания IgA -антител в среднем в 1,6 раза - до 35 (37; 49) мкг/мл ($p < 0,001$). У 4 (14%) пациентов уровень IgA -антител слюны повысился более чем в 2 раза. После завершения сезона палинации концентрация IgA -антител снизилась на 40% и достоверно не отличалась от первоначальных показателей. У пациентов II группы, повышение уровня IgA -антител зарегистрировано только в 68% случаев. У этих больных содержание IgA -антител после окончания курса слАСИТ повысилось в 1,3 раза ($p < 0,005$). Это на 34% ниже показателей изменения содержания IgA -антител, по сравнению с больными I группы ($p < 0,001$). У 8 (32%) пациентов динамики уровня IgA -антител в процессе слАСИТ не отмечено. Повышение содержания аллерген-специфических IgA -антител в процессе слАСИТ не было обусловлено транссудацией из сыворотки крови, поскольку динамики уровня альбумина, как показателя степени транссудации, зарегистрировано не было. К концу года от начала лечения у больных I группы концентрация IgE -антител в слюне снизилась в 1,2 раза, что согласуется с данными других авторов [13]. У пациентов II группы, содержание секреторных IgE -антител достоверно не изменилось.

При изучении динамики уровня АТ к медиаторам в процессе иммунотерапии отмечено нарастание содержания антител к брадикинину, серотонину, вазопрессину, гистамину. Обращает на себя внимание, что у 28% пациентов при применении высоких доз аллергенов, максимальный прирост уровня АТ к гистамину отмечается в процессе лечения (28%), а в период палинации его со-

Таблица 1

Показатели общего и местного иммунитета у больных поллинозом через 12 месяцев после слАСИТ

Показатели	Объект исследования	I группа (max дозы), n=25 Me (LQ; UQ)	p	II группа (min дозы) n=25 Me (LQ; UQ)
ИНФ-γ, пг/мл	сыворотка крови	41 (37; 42)	>0,05	42 (41; 42)
ИЛ-4 пг/мл	сыворотка крови	55 (55; 70)	>0,05	60 (55; 65)
IgE общий МЕ/мл	сыворотка крови	149 (117; 174)	>0,05	159 (61; 219)
IgA-антитела Мкг/мл	сыворотка крови	17 (14; 23)	>0,05	17 (14; 25)
IgE-антитела МЕ/мл	сыворотка крови	15,5 (14; 19)	>0,05	16,8 (15; 17,8)
АТ к гистамину ОП ₄₅₀ нм	сыворотка крови	0,589 (0,517; 0,625)	<0,005	0,467 (0,388; 0,528)
АТ к серотонину ОП ₄₅₀ нм	сыворотка крови	0,639 (0,605; 0,639)	>0,05	0,605 (0,461; 0,724)
АТ к брадикинину ОП ₄₅₀ нм	сыворотка крови	0,490 (0,427; 0,562)	>0,05	0,499 (0,405; 0,520)
АТ к вазопрессину ОП ₄₅₀ нм	сыворотка крови	0,484 (0,454; 0,494)	>0,05	0,488 (0,421; 0,524)
sIgA мкг/мл	секрет ротовой полости	110 (100; 120)	>0,05	120 (90; 120)
IgA-антитела мкг/мл	секрет ротовой полости	21 (17; 22)	>0,05	21 (15; 22)
IgE-антитела МЕ/мл	секрет ротовой полости	17,6 (16; 18,4)	<0,05	20,9 (20; 21,1)

держание не повышается. У больных II группы темпы прироста показателей в период лечения и в сезон пыления причинно-значимых растений достоверно не различаются (10% и 3% соответственно). Через 12 месяцев от начала лечения уровень АТ к гистамину вырос на 40% у пациентов в I группе и на 13% во II группе ($p < 0,05$).

В процессе слАСИТ отмечено снижение содержания ИЛ-4 в сыворотке крови на 7% у больных I группы и 5% - II группы ($p > 0,05$). У всех больных зарегистрировано достоверное повышение концентрации ИНФ-γ по сравнению с начальным уровнем. Прирост через 12 месяцев от начала слАСИТ составил в I группе - 24%, во второй группе - 20% ($p > 0,05$). Аналогичные результаты получены и в других исследованиях [14, 15].

Положительный клинический эффект с учетом хороших и отличных результатов получен у 86% больных I группы, и у 56% больных II

группы. Интенсивность симптомов респираторной аллергии в период пыления, потребность в лекарственных препаратах были выше у больных II группы.

Заключение

Таким образом, слАСИТ является патогенетическим, высокоэффективным методом лечения аллергических заболеваний. Она вызывает изменения профиля цитокинов Т-хелперов в сторону Th-1, стимулирует образование секреторных аллерген-специфических IgA-антител, снижает содержание IgE-антител в слюне, тем самым, угнетая иммунный ответ на причинно-значимые аллергены. Назначение высоких доз пероральных аллергенов позволяет добиваться значительного уменьшения симптомов заболевания у большинства пациентов и является более предпочтительным.

Литература

1. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. М., Фармарус Принт, 1998: 252 с.
2. Drachenberg KJ., Urban E., Woroniecki S.R. Sublingual specific immunotherapy of adults and children: a post-marketing surveillance study. *Allergol Immunol*, 2004, Vol.32: p. 76 - 81
3. Potter P.C. Update on sublingual immunotherapy. *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 2006, Vol. 96: p. 22 - 25
4. Aghayan-Ugurluoglu R., Ball T., Vrtala S. et al. Dissociation of allergen-specific IgE and IgA responses in sera and tears of pollen-allergic patients: a study performed with purified recombinant pollen allergens. *J. Allergy Clin Immunol.*, 2000, Vol. 105: p. 803-813
5. Kramer MF, Jordan TR, Pfrogner E. et al. Humoral mucosal immunity in allergic rhinitis. *Laryngorhinootologie (German.)*, 2005, Vol. 84: p. 503 - 510
6. Jutel M., Akdis M., Budak F. et al. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur J. Immunol.*, 2003, Vol. 33: p. 1205 - 1214.
7. Moingeon P., Batard T., Fadel R. et al. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61: p. 151-165
8. Tari MG., Manicon M., Madonna F. et al. Immunologic evaluation of 24 month course of sublingual immunotherapy. *Allergol Immunopathol.*, 1994, Vol. 22: p. 209-216
9. Reider N. Sublingual immunotherapy for allergic rhinoconjunctivitis - the seeming and the real. *Int Arch Allergy Immunology*. 2005, Vol. 137: p. 181-186
10. Манжос М.В., Шкадов С.А., Никишин А.В. и др. Определение специфических антител в слюне больных поллинозом методом иммуоферментного анализа. *Биотехнология*, 2006, №4: с. 93-95
11. Манжос М.В., Шкадов С.А., Никишин А.В., Петроченко С.Н., Демерчян С.А., Абраменко Т.В., Мягкова М.А. Иммуоферментный метод определения специфических антител в слюне больных поллинозом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2006, №5: с. 44-45
12. Мягкова М.А., Савицкий А.А., Бачурин С.О. Иммуохимические свойства антител к дерморфину и его аналогам у больных с нейродегенеративными расстройствами. *Иммунология*. 1999, №4: с. 52-55.
13. Marcucci F., Sensi L., Di Cara G. et al. Dose dependence of immunological response to sublingual immunotherapy. *Allergy*. 2005, Vol. 60: p 952-956
14. Arian C, Bahceciler N.N, Deniz G. et al. Bacillus Calmette-Guerin-induced interleukin-12 did not additionally improve clinical and immunologic parameters in asthmatic children treated with sublingual immunotherapy. *Clin Exp Allergy*. 2004, Vol. 34: p. 398-405
15. Cosmi L, Santarlasci V, Angeli R et al. Sublingual immunotherapy with Dermatophagoides monomeric allergoid down-regulates allergen-specific immunoglobulin E and increases both interferon-gamma and interleukin-10 production. *Clin Exp Allergy*. 2006, Vol. 36: p. 261-272

*Киселева Раиса Юрьевна
Эл. Почта: uchura@mail.ru.
Телефон: 8-926-879-84-99.
Почтовый адрес: 119633, г.Москва, ул.
Новопеределкинская, 14-1-8.*

Поступила 11.02.09 г.