

УДК 616.248:[612.42+612.112.93]

DOI: 10.14427/jipai.2016.4.20

Показатели фенотипа лимфоцитов и базофилов у детей с atopической бронхиальной астмой

Е.Г. Асирян, П.Д. Новиков

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Indicators phenotype lymphocytes and basophils in children with asthma

E.G. Asiry, P.D. Novikov

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Цель исследования изучение фенотипа лимфоцитов и базофилов у детей с atopической бронхиальной астмой.

Материалы и методы. Обследовано 150 детей в возрасте от 5 до 18 лет: 130 пациентов с atopической бронхиальной астмой, 20 детей контрольной группы. Определяли уровень следующих показателей лимфоцитов и базофилов: CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD19+CD23+, CD203c+, CD203c+CD63+, CD203c+IgE.

Результаты. При изучении показателей фенотипа лимфоцитов установлено, что уровень CD4+, CD4+CD25+, CD19+ лимфоцитов не имел статистически значимых отличий от показателя детей контрольной группы ($p>0,05$). Относительный уровень CD3+ лимфоцитов статистически значимо отличался от уровня контрольной группы ($p<0,05$), однако находился в пределах референтных значений. Уровень CD203c+CD63+ базофилов, CD203c+IgE базофилов достоверно выше у детей с atopической астмой, чем у детей контрольной группы ($p<0,01$), в то же время абсолютный уровень CD203c+ базофилов не имел достоверных отличий.

Заключение. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют о том, что у детей с atopической бронхиальной астмой уровень активированных базофилов статистически значимо выше, что свидетельствует об их участии в развитии заболевания.

Ключевые слова

Фенотип, atopическая астма, базофилы, лимфоциты.

Summary

The *aim* of our research to examine the phenotype of lymphocytes and basophils in children with atopical asthma.

Materials and methods. A total of 150 children aged 5 to 18 years: 130 patients with asthma, 20 children in the control group. Determines the level of the following indicators of lymphocytes and basophils: CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD19+CD23+, CD203c+, CD203c+CD63+, CD203c+IgE.

Results. In the study of lymphocyte phenotype determined that the level of CD4+, CD4+CD25+, CD19+ lymphocytes had no statistically significant differences from the control group of children ($p>0,05$). The relative level of CD3+ lymphocytes was significantly different from the control group level ($p<0,05$), but was within the reference values. The level of CD203c+CD63+ basophils, CD203c+IgE was significantly higher in children with asthma than children in the control group ($p<0,01$), while the absolute level CD203c+ basophils had no significant differences.

Conclusion. The findings of the study results suggest that children with asthma the level of activated basophils statistically higher, indicating their participation in the development of the disease.

Keywords

Phenotype, asthma, basophils, lymphocytes.

Введение

Бронхиальная астма – это хроническое воспалительное заболевание бронхов, при котором наблюдается обратимая обструкция, которая приводит к приступам удушья [1, 2]. Нарушение функции иммунной системы является основой

патогенеза atopической астмы. Известно, что при данном заболевании наблюдается дисбаланс в системе Т-хелперов, при этом преобладают Т-хелперов 2-го типа, снижается активность Т-хелперов 1-го типа [3, 4]. Одной из главных структур, расположенных на поверхности зрелых

T-лимфоцитов является CD3+ рецептор, состоящий из 5 полипептидных цепей (γ , δ , ϵ , η , ζ). Лимфоциты, несущие на своей поверхности CD4+ рецепторы – T-лимфоциты-хелперы/индукторы, выполняют, главным образом, хелперную функцию помогают В-клеткам превращаться в антителопродуцирующую плазматическую клетку. Для В-лимфоцитов характерна способность дифференцироваться в плазматические клетки и продуцировать антитела, а также играть роль антигенпредставляющих клеток [5]. При обострении atopической бронхиальной астмы наблюдается повышение уровня В-лимфоцитов, свидетельствующее об активизации В-клеточного звена иммунной системы [2, 5].

В последние годы активно изучается роль базофилов в иммунной защите, а также их значение в патогенезе аллергических заболеваний. Одним из новых методов выявления аллергии является определение количества активированных базофилов [6, 7]. Общепризнанным маркером базофилов крови, наиболее часто используемым для их идентификации, является CD203c (ectonucleotide pyrophosphatase (E-NPP3)) [8, 9]. Активация базофилов реализуется через специфические рецепторы на мембране этих клеток. Дегрануляция базофилов сопровождается появлением активационных молекул – CD203c и CD63 [10, 11, 12]. Базофилы и тучные клетки являются участниками развития аллергических заболеваний, таких как астма [6, 7].

Целью исследования явилось изучение фенотипа лимфоцитов и базофилов у детей с atopической бронхиальной астмой.

Материалы и методы

В ходе работы обследовано 130 детей в возрасте от 5 до 18 лет, находившихся на лечении в аллергологическом отделении УЗ «Витебский областной детский клинический центр». Все дети наблюдались по поводу atopической бронхиальной астмы (АБА). Диагноз заболевания установлен и подтвержден в стационаре на основании международных рекомендаций, обоснован данными анамнеза, клиническими проявлениями заболевания [13]. Определяли уровень следующих показателей лимфоцитов и базофилов: CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD19+CD23+, CD203c+CD63+, CD203c+IgE, а также определяли уровень общего IgE в сыворотке крови у детей с бронхиальной астмой. Контрольную группу составили 20 здоровых детей обоих полов 5-18 лет, не имеющих аллергических заболеваний.

Фенотипирование клеток проводили на точном цитометре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter Inc., США) с использованием моноклональных антител производства ОДО «НИКП РЕСАН», Беларусь. Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор OptiLyse С.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для принятия решения о виде распределения количественного признака использовали критерий Шапиро-Уилка. Для переменных с нормальным распределением, использовали такие параметры, как среднее значение и среднее квадратическое отклонение. Для описания признака распределение, которого отличается от нормального, использовали медиану и интерквартильный интервал. Использовались непараметрические методы статистического исследования, различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Уровень лейкоцитов, а также относительное и абсолютное количество лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой не имел статистически значимых отличий с показателями детей контрольной группы. Количество T-лимфоцитов (CD3+) у пациентов с бронхиальной астмой составило 74,6% [70,60-77,40%], что статистически отличалось от показателей контрольной группы, где уровень CD3+ лимфоцитов составил 70,65% [68,70-72,60%] ($p < 0,05$). Однако, следует отметить, что в обеих группах показатели не выходили за пределы референтных значений (56-84%).

Уровень CD4+ лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой составил 40,85% [36,8-45,0%], достоверных отличий с контрольной группой не установлено ($p > 0,05$). Однако при детальном анализе следует отметить, что у 32 (24,62%) детей уровень CD4+ лимфоцитов был меньше 37%, что ниже референтных значений (37-50%). Абсолютный уровень CD3+, CD4+ лимфоцитов не имел достоверных отличий.

Уровень клеток, несущих на своей поверхности CD4+CD25+ рецептор, статистически значимо не отличался от контрольной группы и составил 0,70% [0,30-1,30%]. Несмотря на то, что относительный и абсолютный уровень CD4+CD25+ лимфоцитов не имел статистических различий между опытной и контрольной группами, у 27 (20,77%) детей выявлен высокий уровень этого показателя. Уровень CD4+CD25+ лимфоцитов у этих пациентов превышал референтные значения (<2% от T-лимфоцитов), со-

ставил 4,6% [2,8-8,9%], что статистически выше уровня детей контрольной группы ($p < 0,001$). Абсолютный уровень $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой достоверно не отличался от показателя контрольной группы ($p > 0,05$). У пациентов с высоким относительным уровнем $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов абсолютный уровень равен 173,19 кл/мкл [114,54-321,76 кл/мкл], что достоверно выше, чем у детей, не имеющих аллергопатологии ($p < 0,001$).

Относительный и абсолютный уровень В-лимфоцитов ($CD19^+$) у детей с бронхиальной астмой статистически значимо не отличался от уровня детей контрольной группы ($p > 0,05$).

Количество $CD19^+CD23^{++}$ В-лимфоцитов, т.е. В-лимфоцитов с низкоаффинным рецептором для IgE (FcεRII) в группе детей с бронхиальной астмой составило 31,90% [11,60-51,90%], что достоверно выше уровня детей контрольной группы, где этот показатель равен 3,45% [2,10-4,20%] ($p < 0,0001$). Абсолютный уровень этого показателя был тоже в 10 раз выше по сравнению с показателем контрольной группы ($p < 0,0001$).

У детей с атопической бронхиальной астмой уровень $CD203c^+$ базофилов составил 4,00 кл/мкл [3,00-7,00 кл/мкл], что достоверно не отличалось от пациентов контрольной группы ($p > 0,05$). Относительный уровень $CD203c^+CD63^+$ базофилов у детей с бронхиальной астмой составил 66,70% [46,70-80,40%], что достоверно выше в сравнении с детьми контрольной группы, где этот показатель равен 14,02% [12,90-15,80%] ($p < 0,0001$). Абсолютный уровень базофилов, несущих на своей поверхности активационный рецептор $CD203c^+$, у детей с бронхиальной астмой статистически значимо выше, чем в контрольной группе ($p < 0,0001$). Таким образом, у детей с бронхиальной астмой достоверно чаще выявлялись высокие показатели относительного и абсолютного уровня $CD203c^+CD63^+$ базофилов.

При изучении уровня активированных базофилов, несущих на своей поверхности IgE, получены следующие результаты. Относительный уровень $CD203c^+IgE$ базофилов составил 35,55% [21,70-46,80%], абсолютный уровень равен 1,43 кл/мкл [0,75-2,30 кл/мкл]. Оба показателя статистически значимо выше уровня детей контрольной группы ($p < 0,01$) (таблица 2). Низкий уровень $CD203c^+IgE$ базофилов (<30%) имели 49 (37,69%) детей, при этом у 4 детей установлен низкий уровень $CD203c^+CD63^+$ базофилов, а 45 (34,62%) пациентов имели высокий уровень $CD203c^+CD63^+$ рецептора.

Ранее было показано, что повышение уровня IgE в сыворотке крови приводит к повыше-

нию экспрессии высокоаффинного рецептора [10]. Так, сопоставив результаты определения общего IgE с уровнем $CD203c^+$, $CD203c^+CD63^+$, $CD203c^+IgE^+$ базофилов получены следующие результаты. У 3 детей, имевших уровень $CD203c^+$ выше референтных значений, показатель общего IgE был значительно повышен, более 700 МЕ/мл. У 8 детей, имевших уровень $CD203c^+CD63^+$ ниже референтных значений, уровень общего IgE составил 890 МЕ/мл (520 МЕ/мл; 3000 МЕ/мл), что значительно превышает норму. У детей, имевших низкие уровни общего IgE (<100 МЕ/мл), показатель $CD203c^+CD63^+$ составил 74,1% (47,7%; 89,5%), что достоверно выше показателя детей контрольной группы ($p < 0,05$). У детей с низким показателем $CD203c^+IgE^+$ уровень общего IgE составил 465 МЕ/мл (270 МЕ/мл; 700 МЕ/мл). Таким образом, у детей с бронхиальной астмой в период ремиссии не прослеживается четкая взаимосвязь уровня активационных рецепторов базофилов с уровнем общего IgE.

Результаты, полученные в исследовании, выявили следующие особенности иммунного статуса у детей с данной патологией. Относительный уровень $CD3^+$ лимфоцитов, относительный и абсолютный уровень $CD4^+$ лимфоцитов, $CD4^+CD25^+$ лимфоцитов, $CD19^+$ лимфоцитов не имели достоверных отличий в сравнении с уровнем детей контрольной группы. Относительный уровень $CD3^+$ лимфоцитов статистически значимо отличался от контрольной группы. Уровень $CD19^+CD23^{++}$ лимфоцитов у пациентов с бронхиальной астмой в 10 раз превышал уровень этого показателя у детей контрольной группы. Известно, что соотношение уровня $CD19^+CD23^+$ лимфоцитов к уровню $CD19$ лимфоцитов, выраженное в процентах, является индексом аллергического воспаления. При индексе больше 70% диагностируют атопическую форму бронхиальной астмы [14]. 126 детей имели статистически значимо более высокий уровень этого показателя в сравнении с детьми контрольной группы ($p < 0,0001$), при этом у 109 (83,85%) детей наблюдался повышенный уровень общего IgE (>100 МЕ/мл). Мы сопоставили уровень $CD19^+CD23^{++}$ лимфоцитов с уровнем общего IgE. Установлена корреляция между уровнем общего IgE и уровнем $CD19^+CD23^+$ лимфоцитов ($r = +0,247$; $p < 0,05$). Учитывая полученные данные, уровень $CD19^+CD23^+$ лимфоцитов может служить биомаркером атопической бронхиальной астмы.

Данные, полученные в результате различных исследований, значительно расширили представление о роли базофилов и тучных клеток в патогенезе аллергических заболеваний [6, 7, 14]. Изучая пока-

Таблица 1. Абсолютное и относительное содержание субпопуляций лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой

Показатели	Единицы измерения	Me [LQ-UQ]	
		Дети с БА (n=130)	Контрольная группа (n=20)
Лейкоциты	$\times 10^9$	7,22 [6,20-8,80]	7,05 [6,50-7,80]
Лимфоциты	%	42,00 [36,00-48,00]	39,00 [34,00-44,00]
	$\times 10^9$	3,02 [2,48-3,83]	2,68 [2,52-3,22]
CD3+	%	74,6 [70,60-77,40]	70,65 [68,70-72,60]*
	кл/мл	2,18 [1,81-2,86]	1,94 [1,80-2,29]
CD4+	%	40,85 [36,80-45,00]	42,95 [39,80-44,60]
	кл/мл	1,22 [0,97-1,54]	1,17 [1,00-1,23]
CD4+CD25+	% от лимфоцитов	0,50 [0,20-1,00]	0,55 [0,30-0,80]
	кл/мкл	16,18 [6,05-31,46]	17,09 [10,49-19,74]
CD19+	%	14,20 [12,70-16,40]	13,50 [11,40-14,60]
	кл/мкл	442,67 [330,72-554,85]	372,56 [286,82-435,25]
CD19+CD23++	% от CD19+ лимфоцитов	31,90 [11,60-51,90]	3,45 [2,10-4,20]**
	кл/мкл	124,73 [52,48-221,89]	10,83 [8,37-15,50]**

Примечание: * – достоверные отличия между группами с $p < 0,05$; ** – достоверные отличия между группами с $p < 0,0001$

Таблица 2. Фенотипирование базофилов у детей с бронхиальной астмой

Показатели	Единицы измерения	Me [LQ-UQ]	
		Дети с БА (n=130)	Контрольная группа (n=20)
CD203c+	кл/мкл	4,00 [3,00-7,00]	3,00 [2,00-4,00]
CD203c+CD63+	%	66,70 [46,70-80,40]	14,20 [12,90-15,80]**
	кл/мкл	2,30 [1,30-4,62]	0,45 [0,43-0,55]**
CD203c+IgE	%	35,55 [21,70-46,80]	20,35 [17,50-24,00]*
	кл/мкл	1,43 [0,75-2,30]	0,63 [0,48-0,89]*

Примечание: * – достоверные отличия между группами с $p < 0,01$; ** – достоверные отличия между группами с $p < 0,0001$

затели иммунного статуса у детей с бронхиальной астмой установлено, что уровень CD203c+ базофилов достоверно не отличался от уровня детей контрольной группы. В тоже время как относительный, так и абсолютный уровень CD203c+CD63+ базофилов, CD203c+IgE базофилов статистически значимо выше в сравнении с уровнем контрольной группы. Кроме того, обнаружено значительное повышение уровня CD19+CD23+ В-лимфоцитов у детей с бронхиальной астмой. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии базофилов и CD19+CD23+ В-лимфоцитов в патогенезе бронхиальной астмы, определение этих клеток является необходимым для оценки иммунного статуса детей с этим заболеванием.

Выводы

1. У детей с бронхиальной астмой относительный и абсолютный уровень CD3+, CD4+, CD4+CD25+, CD19+ лимфоцитов не имел статистически значимых отличий с показателями контрольной группы.

2. Уровень CD19+CD23++ лимфоцитов достоверно выше при бронхиальной астме в сравнении с уровнем детей, не имеющих аллергических заболеваний.

3. Показатели CD203c+CD63+ базофилов, CD203c+IgE базофилов при бронхиальной астме статистически значимо превышали уровень здоровых детей, при нормальном абсолютном уровне CD203c+ базофилов.

Литература

1. Жерносок В.Ф. Диагностика и лечение аллергических болезней у детей. Минск: РИВШ. 2013: 120 с.
2. Новикова В.И., Новиков П.Д., Титова Н.Д. Гетерогенность аллергии при бронхиальной астме у детей. Вестник ВГМУ 2014; №13(4): 110-116.
3. Agrawal D. K., Shao Z. Pathogenesis of allergic airway inflammation. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2010; 10(1): 39-48.
4. Matusovsky O.S., Nakada E.M., Kachmar L., Fixman E.D., Lauzon A.M. CD4+ T cells enhance the unloaded shortening velocity of airway smooth muscle by altering the contractile protein expression. *J. Physiol.* 2014; 15(592): 2999-3012.
5. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Клиническая иммунопатология: руководство. М.: Мед. лит. 2009: 464 с.
6. Kang M.G., Song W.J., Park H.K., Lim K.H., Kim S.J., Lee S.Y., Kim S.H., Cho S.H., Min K.U., Chang Y.S. Basophil Activation Test with Food Additives in Chronic Urticaria Patients. *Clinical Nutrition Research.* 2014; 3: 9-16.
7. Синельникова Н.А., Бычкова Н.В., Калинина Н.М. Особенности иммунного ответа и активации базофилов у детей с хронической крапивницей. *Медицинская иммунология* 2015; 17(1): 39-46.
8. MacGlashan D. Jr. Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal anaphylactic degranulation processes. *Clin. Exp. Allergy.* 2010; № 40(9): 1365-77.
9. Chinuki Y., Kaneko S., Dekio I. et al. CD203c expression-based basophil activation test for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin. Exp. Allergy.* 2012; 129: 1404-06.
10. Янченко В.В., Величинская О.Г., Новиков Д.К. Фенотипирование базофилов крови IgE-связывающим пептидом при хронической крапивнице. *Имунопатология, аллергология, инфектология* 2014; 2: 19-22.
11. Siracusa M.C., Kim B.S., Spengel J.M., Artis D. Basophils and allergic inflammation Glossary. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2013; 132: 789-801.
12. Konstantinou G.N., Asero R., Ferrer M., Knol E.F., Maurer M., Raap U., Schmid-Grendelmeier P., Skol P. S., Grattan C. E. H. EAACI taskforce position paper: evidence for autoimmune urticarial and proposal for defining diagnostic criteria. *Allergy.* 2013; 68: 27-36.
13. Pocket Guide for Asthma Management and Prevention (for Adults and Children than 5 Years) 2014 (update). The GINA reports are available on www.ginasthma.org, 32 p.
14. Способ диагностики атопической формы бронхиальной астмы у детей: пат. 2339951 РФ №2339951 от 15.06.2007. /И.А. Громов, Л.С. Намазова, Е.Л. Семикина, Н.И. Вознесенская; заявитель Государственное учреждение Научный центр здоровья детей РАМН (ГУ НЦЗД РАМН) (RU) – № 2339951; заявл. 15.06.2007. Положительное решение от 27.11.2008.

Сведения об авторах:

Асирян Е.Г. - доцент кафедры педиатрии Витебского государственного медицинского университета, e-mail: lana.asiryun@mail.ru.

Новиков П.Д. - профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии Витебского государственного медицинского университета, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27.

Поступила 21.10.2016 г.