

ЦИТОКИНЫ «КОЖНОГО ОКНА» ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ В СОЧЕТАНИИ С ПИЩЕВОЙ АЛЛЕРГИЕЙ

© 2018 г. П. Ю. Исаев, В. В. Климов, М. И. Романова, В. С. Свиридова, О. А. Найдина, Н. А. Пронина

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

Поступила: 12.05.2018. Принята: 23.06.2018

Обследовано 95 пациентов в возрасте 18–60 лет с бронхиальной астмой, круглогодичным аллергическим ринитом без или в сочетании с пищевой аллергией. Исследовались IFN- γ , IL-4, IL-17 и IL-22 в экссудатах «кожного окна». Выявлено существенное повышение содержания IL-22 при atopической патологии в сочетании с пищевой аллергией.

Ключевые слова: бронхиальная астма, пищевая аллергия, цитокины, кожное окно

DOI: 10.31857/S102872210002402-7

Адрес: 634050 Томск, ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России. Исаев Павел Юрьевич.

Тел.: +79039520022, **E-mail:** pavel_isaev80@mail.ru

Авторы:

Исаев П. Ю., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия;

Климов В. В., д. м. н., профессор, зав. кафедрой иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия;

Романова М. И., аспирант кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия;

Свиридова В. С., к. м. н., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия;

Найдина О. А., к. м. н., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия;

Пронина Н. А., к. м. н., ассистент кафедры иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

В девиации иммунных ответов на аллергены при atopической конституации и клинических atopиях большое значение имеют иммунорегуляторные Т-клетки: естественные (Treg), индуцибельные (Th3, Tr1, iTreg) и адаптивные (Th1, Th2, Th17, Th22) — которые реализуют свою функциональную активность через цитокины

[1, 2, 3, 4]. Классической парадигмой персистирующего atopического воспаления при астме, аллергическом рините и atopическом дерматите в течение долгих лет со времён Coffman и Mossman в иммунологии считается парадигма Th1/Th2 с поляризацией активности в сторону Th2 [5]. Однако источниками любых цитокинов и хемокинов являются не только адаптивные хелперные лимфоциты (Th), включая Th1, Th2, Th17, Th22, дендритные клетки, макрофаги, но и недавно охарактеризованные врождённые лимфоидные клетки (innate lymphoid cells — ILC) нескольких субпопуляций: ILC1, ILC2, ILC17, ILC22 и другие [6]. Это усложняет понимание иммунопатогенеза atopий и требует новых подходов в исследованиях atopических болезней. Дополнительной проблемой является перекрёстная аллергия с её сложными механизмами, до настоящего времени не исследованными до конца. Новая концепция аллерген-ассоциированных молекулярных паттернов (ААМП) [7], возможно, позволит по-новому интерпретировать перекрёстную аллергию при atopических болезнях.

Целью настоящей работы было исследование цитокинов в кожных экссудатах, полученных с помощью «кожного окна» у пациентов с бронхиальной астмой без и в сочетании с пищевой аллергией.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на базе Сибирского государственного медицинского университета и Межвузовской больницы г. Томска. Исследование одобрено локальным этическим комитетом, все участники исследования подписывали информированное согласие на добровольное собственное участие в научном исследовании.

Первоначально было проведено анкетирование пациентов обоего пола с бронхиальной астмой и круглогодичным аллергическим ринитом в периоде ремиссии в возрасте 18–60 лет на предмет наличия у них в анамнезе проявлений пищевой аллергии. Средний возраст пациентов составил $38,6 \pm 12,1$ лет. Всем пациентам на предварительном этапе были выставлены соответствующие диагнозы астмы и круглогодичного аллергического ринита (КАР) на основе общепринятых критериев. Контрольной группой служили 20 здоровых добровольцев в возрасте 20 ± 2 лет.

В результате проведенного анкетирования были сформировано три группы: бронхиальная астма без пищевой аллергии ($n=29$), астма с пищевой аллергией ($n=20$), КАР без пищевой аллергии ($n=46$). Всем отобраным пациентам провели кожные аллергопробы методом прик и по потребности – внутриможно, а также определение специфических IgE методом ИФА к следующим аллергенам: *Der p 1*, *Bos d 5*, *Bos d 12*, *Pen i 1*, *Ara h 1* для объективной верификации пищевой сенсибилизации. Набор аллергенов соответствовал характеру основного atopического заболевания и выявленной в анамнезе пищевой аллергии.

Бесклеточные кожные экссудаты для определения концентрации цитокинов IFN- γ , IL-4, IL-17 и IL-22 в них получили при помощи метода, оригинально предложенного J. W. Rebusk и J. H. Crowley [8], который в дальнейшем был модифицирован и запатентован В. В. Климовым и соавторами (№ 1534395 на изобретение «Способ диагностики аллергического диатеза» (1990)), а в последствии доработан и представлен как медицинская технология «Способ оценки минимальной воспалительной активности кожи при atopическом дерматите в стадии ремиссии» ФС№ 2010/217 от 10.06.2010 (В. В. Климов, А. А. Денисов, Е. К. Фирсова и др.).

Для постановки «кожного окна» использовали 70% этиловый спирт в качестве антисептического раствора, одноразовый стерильный скальпель, пластиковую камеру объемом 1,2 мл



Рис. 1. Постановка кожной камеры

(см. рисунок 1), 0,9% раствор натрия хлорида, гипоаллергенный пластырь.

Участок кожи на передней поверхности предплечья обрабатывали 70% этиловым спиртом. На выбранном участке диаметром 0,5 см при помощи скальпеля скребущими движениями удаляли клетки рогового слоя эпидермиса до появления специфического блеска, при этом избегали появления кровавой росы, оставляя нетронутыми слой шиповатых и базальных клеток и базальную мембрану эпидермиса. На данном участке кожи устанавливали пластиковую камеру объемом 1,2 мл, направленную основанием к коже.

Определение концентрации указанных цитокинов в супернатанте проводилось методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА), при помощи наборов реагентов «ИЛ-4-ИФА-БЕСТ», «ИЛ-17-ИФА-БЕСТ», «гамма-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ», «ИЛ-10-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», г. Новосибирск), для IL-22 «HumanIL-22» («R&D Systems», USA). Проведение ИФА осуществляли точно следуя инструкции по применению от производителя. Концентрацию цитокинов вычисляли методом перерасчета на 1 г белка с учетом общего белка, определяемого микробиуретовым методом.

Камеру наполняли 0,9% раствором натрия хлорида и фиксировали гипоаллергенным пластырем. Камеру экспонировали в течение 6 часов, после чего осторожно снимали. Ее содержимое собирали пипеткой с индивидуальным стерильным пластиковым наконечником и переливали в пробирку с плотно закрывающейся крышкой. Далее ее помещали в центрифугу для получения бесклеточного экссудата – супернатанта, в котором в дальнейшем определяли концентрацию цитокинов.

Для проведения статистической обработки полученных в ходе исследований результатов использовали статистический пакет «Statistica»

версия 6.0 для Windows. Первоначально осуществлялась проверка количественных показателей на нормальность распределения. Поскольку оказалось, что данные не подчинялись нормальному закону распределения, применялись непараметрические критерии. Анализ количественных результатов проводили сравнением независимых выборок с помощью критерия Манна-Уитни (Mann–Whitney U-test). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные результаты отражены в **таблице 1**. Колебания IFN- γ в трёх клинических группах и по отношению к контролю оказались недостоверными, что может свидетельствовать об отсутствии значимой вовлечённости Th1-клеток в регуляторный и воспалительный процессы при atopических состояниях. Однако концентрация IL-4 – ключевого цитокина Th2 оказалась у больных КАР и астмой без пищевой аллергии парадоксальным образом ниже контроля, но при этом выше в группе больных с астмой в сочетании с пищевой аллергией.

Колебания IL-17 – ключевого цитокина новой хелперной субпопуляции Th17, играющей важную роль в воспалительных процессах на локальных уровнях с вовлечением многих клеток, но преимущественно нейтрофилов [9, 10, 11], оказались достоверно ниже уровня контроля во всех трёх клинических группах.

Изменения концентраций IL-22 – ключевого цитокина ещё одной новой хелперной субпопуляции Th22, также значимой в регуляции

процессов иммунных ответов и поддержания гомеостаза на локальных уровнях [3, 12, 13, 14], имели существенные особенности: 1) статистически достоверное повышение по отношению к контролю в группах пациентов без пищевой аллергии и 2) статистически значимое увеличение при астме с пищевой аллергией по отношению к группам больных без пищевой аллергии.

ОБСУЖДЕНИЕ

В клиническом аспекте давно известна взаимно отягчающая роль сочетания нескольких atopических аллергических болезней у одного человека. К числу таких факторов относится и пищевая аллергия [15, 16]. Однако конкретные механизмы такого отягощения остаются не до конца исследованными. Интересно, что в теоретическом плане показана синергичная роль Th2 и Th22, также как и Th1 и Th17 [12]. В нашем исследовании обнаружено одновременное существенное повышение IL-4 и IL-22 только в случаях atopии, осложнённой пищевой аллергией. Таким образом, проведённые нами исследования в клинических группах согласуются с теоретическими постулатами и свидетельствуют о важной роли субпопуляции Th22 при сочетании нескольких вариантов atopической патологии у одного пациента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Bieber T.* Atopic Dermatitis. *N Engl J Med* 2008, 358, 1483–1494.
2. *Farahani R., Sherkat R., Hakemi G. M. et al.* Cytokines (Interleukin-9, IL-17, IL-22, IL-25 and IL-33) and Asthma. *Adv Biomed Res* 2014, 3, 127–131.

Таблица 1. Концентрация цитокинов (IFN- γ , IL-4, IL-17 и IL-22) (Me (Q1-Q3)) в экссудате «кожного окна» у пациентов с бронхиальной астмой

Группа \ Показатель	IFN- γ (пг/г белка)	IL-4 (пг/г белка)	IL-17 (пг/г белка)	IL-22 (пг/г белка)
Контрольная группа (n=20)	0,629 (0,381-1,102)	0,277 (0,267–0,345)	1,596 (1,414–1,759)	1,638 (1,185–1,834)
Больные КАР (n=46)	0,574 (0,401-0,787)	0,184 (0,147–0,204) p1	1,078 (0,779–1,328) p1	1,847 (1,575–2,092) p1
Астма без пищевой аллергии (n=29)	0,443 (0,399-0,972)	0,235 (0,190–0,269)	1,108 (0,782–1,328) p1	1,897 (1,567–2,090) p1
Астма с пищевой аллергией (n=20)	0,476 (0,431–0,897)	0,435 (0,322–0,471) p1, p2, p3	1,127 (0,890–1,434) p1	2,346 (1,124–2,479) p1, p2, p3

Примечание: Me – медиана, Q1–1-й квартиль, Q3–3-й квартиль, p2–4 – достоверность различий в сравнении с контрольной группой (p<0,05).

3. Li Y.-Y., Zhang H.-L., Yan G.-G.E.N.T. Serum IL-17 and IL-22 Level Changes in Allergic Rhinitis Patients and its Relationship with Disease Severity. *Heilongjiang Med. J* 2015, 8, 15–19.
4. Tsvetkova-Vicheva V., Konova E., Lukanov T. et al. Interleukin-17 Producing T Cells could be a Marker for Patients with Allergic Rhinitis. *IMAJ*, 2014, 16, 358–362.
5. Lambrecht B.N., Hammad H. The immunology of asthma. *Nature Immunology* 2015, 16, 45–56.
6. Walker J.A., Barlow J.L. & McKenzie A.N. J. Innate lymphoid cells—how did we miss them? *Nature Rev Immunol* 2013, 13, 75–87.
7. Pali-Schöll I., Jensen-Jarolim E. The concept of allergen-associated molecular patterns (AAMP). *Current Opinion in Immunology* 2016, 42, 113–118.
8. Rebuck J.W., Crowley J.H. A method of studying leukocytic functions *in vivo*. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1955, 59 (5), 757–805.
9. Essakalli M., Brick C., Bennani N. et coll. Le lymphocyte Th17 dernier-né de la famille des lymphocytes T CD4⁺. *Pathologie Biologie* 2009, 4, 54–61.
10. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol* 2006, 6, 329–333.
11. Harrington L. Interleukin-17—producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 2005, 6 (11), 1123–1132.
12. Araujo-Pires A. C., Francisoni C. F., Bigueti C. C. et al. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status/ *J Appl Oral Sci*. 2014, 22 (4), 336–346.
13. Akdis M., Palomares O., van de Veen W. et al. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 2012, 129 (6), 1438–1449.
14. Wawrzyniak M., Wawrzyniak P., Ruckert B. et al. Isolation and characterisation of human IL-22-producing T cells. *Allergy* 2013, 68 (Suppl 97), 664.
15. Kumar R. Food allergy in bronchial asthma: Diagnostic modalities. *Indian Journal of Allergy, Asthma and Immunology* 2013, 27 (2), 108–114.
16. Gauthier M., Ray A., Wenzel S. Evolving concepts of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2015, 192(6), 660–668.

“SKIN WINDOW” CYTOKINES IN BRONCHIAL ASTHMA ASSOCIATED WITH FOOD ALLERGY

© 2018 P. Yu. Isaev, V. V. Klimov, M. I. Romanova, V. S. Sviridova, Naidina O. A., N. A. Pronina

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Received: 12.05.2018. **Accepted:** 23.06.2018

95 patients at the age of 18–60 years with bronchial asthma, perennial allergic rhinitis with or without associated food allergy were examined. There have been carried out the study of IFN- γ , IL-4, IL-17 and IL-22 in skin exudates that enabled to reveal an essential increase in IL-22 in persons with food allergy.

Key words: bronchial asthma, food allergy, cytokines, skin window

Authors:

Isaev P. Yu., ✉ MD, Assistant Professor of Immunology and Allergy Dept, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia; 634050 Tomsk, Siberian State Medical University. Phone: +79039520022, **E-mail:** pavel_isaev80@mail.ru

Klimov V. V., MD, ScD, PhD, Professor, Head of Immunology and Allergy Dept, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

Romanova M. I., MD, Junior Researcher of Immunology and Allergy Dept, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

Sviridova V. S., MD, PhD, Assistant Professor of Immunology and Allergy Dept, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

Naidina O. A., MD, PhD, Assistant Professor of Immunology and Allergy Dept, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia;

Pronina N. A., MD, PhD, Assistant Professor of Immunology and Allergy Dept, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia.