

# ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ПАЦІЄНТІВ З ЦІЛОРІЧНИМ АЛЕРГІЧНИМ РИНИТОМ ТА СЕНСИБІЛІЗАЦІЄЮ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ

С. Д. Юр'єв<sup>\*,B,C,D</sup>, А. І. Курченко<sup>A,E,F</sup>

Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

A — концепція та дизайн дослідження; B — збір даних; C — аналіз та інтерпретація даних; D — написання статті; E — редагування статті; F — остаточне затвердження статті

Цитування: Астма та алергія. 2022. № 1-2. С. 35–42

Cited: Asthma and allergy. 2022; 1-2, P. 35–42

**Резюме. Мета дослідження** — оцінити особливості імунної відповіді у пацієнтів з алергічним ринітом (АР), сенсibilізованих до кліщів домашнього пилу.

**Матеріали і методи.** У дослідження було включено 60 пацієнтів з АР віком 20-60 років. За рівнем загального IgE (IgE >100 kU/L) пацієнти були розділені на дві групи: з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР. Усім пацієнтам проводили визначення кількості лімфоцитів CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16+56, CD4+CD25+ та визначення рівня цитокінів IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β, IFN-γ. Оцінку синтезу цитокінів проводили в умовах *in vivo* і *in vitro*.

**Результати дослідження.** Згідно отриманих нами даних як у пацієнтів з IgE-залежною, так і у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищення кількості Т-лімфоцитів хелперів, лише у відсоткових значеннях. Однак вірогідних відмінностей за кількістю Т-лімфоцитів хелперів між двома групами пацієнтів з різними формами АР встановлено не було. Зниження кількості В-лімфоцитів було відзначено лише у пацієнтів з IgE-залежною формою АР. Вірогідних відмінностей за кількістю НК-клітин між групою осіб з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР також не було виявлено. Було встановлено зниження кількості Т-регуляторних лімфоцитів лише у групі осіб з IgE-залежною формою АР. Для пацієнтів з IgE-залежною формою АР характерним було зниження рівня цитокінів Т-лімфоцитами хелперами I типу (Th1) — IL-2 і γ-ІФН, підвищення рівня цитокінів Т-лімфоцитами хелперами II типу (Th2) — IL-4, IL-5 та IL-13, а також зниження синтезу цитокінів Т-регуляторними лімфоцитами — IL-10 і TGF-β. При цьому встановлено вірогідне зниження рівня супресивного цитокіну IL-10 порівняно з групою пацієнтів з IgE-незалежною формою АР. Для пацієнтів з IgE-незалежною формою АР характерним було лише підвищення рівня IL-13. Дослідження, проведені в умовах *in vitro*, показали що у пацієнтів з IgE-залежною формою розвиток алергічного запалення відбувається за участю відповіді Th2 лімфоцитів, яка відображається в значно підвищених рівнях експресії IL-4, IL-5 і IL-13, зниженні синтезу IL-2, IFN-γ. Посилення синтезу цих цитокінів було зумовлене зниженням кількості Т-регуляторних лімфоцитів, що і відображалось зниженням синтезу як IL-10, так і TGF-β. У пацієнтів з IgE-незалежною формою АР такої чіткої відповіді Th2 та Т-регуляторних лімфоцитів не спостерігали, що очевидно може свідчити про активацію інших патогенетичних шляхів та залучення інших імунокомпетентних клітин та цитокінів у імунну відповідь на алерген.

**Висновки.** Отримані нами результати відображають, що розвиток алергічного запалення у групі пацієнтів як з IgE-залежною, так і IgE-незалежною формою АР з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу можуть відбуватися різними шляхами. Отримані результати потребують подальшого дослідження, що в подальшому може стати основою для розробки нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

**Ключові слова:** алергічний риніт, кліщі домашнього пилу, імунна відповідь, Т-лімфоцити регуляторні, цитокіни.

## Вступ

Алергічний риніт (АР) є найбільш поширеним із усіх алергічних захворювань, на який страждає близько 400 млн. осіб у всьому світі, і зв'язаний зі зниженням якості життя пацієнтів, продуктивності праці, успішності, розвитком ускладнень тощо. Згідно рекомендацій експертної робочої групи ARIA та Всесвітньої організації охорони здоров'я АР є одним із найбільш значимих факторів ризику розвитку бронхіальної астми [5, 12].

Патогенетичні механізми розвитку АР на сьогодні залишаються предметом дискусій. Відомо, що

Т-лімфоцити є одними із ключових факторів, які регулюють і координують імунні реакції при АР. При цьому Т-лімфоцити хелпери 1 типу (Th1) синтезують цитокіни IFNγ і IL2, які володіють супресивним впливом на синтез IgE, а Т-лімфоцити хелпери 2-го типу (Th2) приймають участь в IgE-опосередкованому алергічному запаленні [5].

Достатньо добре вивченими є механізми atopічного IgE-залежного АР. Відомо, що після попадання на слизову оболонку носа алергени захоплюються антиген-презентуючими клітинами, обробляються і представляються Th2 лімфоцитам. Активовані Th2 вивільняють прозапальні цитокіни IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, що приводить до синтезу імуноглобуліну Е (IgE). При цьому

основними медіаторами синтезу IgE є цитокіни IL-4 і IL-13, серед яких IL-4 служить фактором росту і диференціації В-лімфоцитів, стимулює синтез IgE, дозрівання тучних клітин, а IL-13 посилює експресію CD23, CD72 і антигенів HLA II класу на В-лімфоцитах, стимулює проліферацію В-лімфоцитів і синтез IgE [13]. Тим не менш на сьогодні відомо, що теорія дисбалансу Th2/Th1 є не єдиною причиною, яка веде до надмірної активації Th2 лімфоцитів. Дослідження останніх років доводять важливу роль Т регуляторних лімфоцитів (Treg) в регуляції імунної відповіді, в тому числі і при алергії. Treg є ключовим регуляторним механізмом за рахунок якого організм підтримує імунну толерантність до зовнішніх антигенів і запобігає надмірній активації Th2 лімфоцитів, за рахунок синтезу імуносупресивних цитокінів IL-10, TGF- $\beta$  та IL-35 [3, 5, 10].

Однак нещодавні дослідження показали існування інших не-IgE-залежних механізмів, які сприяють розвитку АР [4, 10]. На сьогодні відомо, що алергени завдяки своїй ферментативній протеолітичній активності можуть безпосередньо активувати епітеліальні клітини і в кінцевому результаті приводити до Th2-залежної імунної відповіді, викликаючи запалення дихальних шляхів [2]. Також нещодавно стало відомо, що деякі алергени можуть безпосередньо впливати на синтез прозапальних цитокінів або індукувати синтез цитокінів епітеліальними клітинами. В свою чергу клітини епітелію під впливом різних тригерних факторів, в тому числі і алергенів, синтезують IL-33, IL-25, TSLP, які впливають на активність «вроджених лімфоїдних клітин» типу 2 (ILC2), спонукають їх до синтезу тих же цитокінів, що і продукують Th2-лімфоцити — IL-5, IL-13, які в подальшому також впливають на В-лімфоцити і викликають синтез IgE [6, 8]. Саме підвищення рівня ILC2 спостерігали в периферичній крові дітей з АР, сенсibilізованих до кліщів домашнього пилу (КДП). При цьому їх рівень корелював із тяжкістю АР [14]. Інше дослідження продемонструвало, що алергени КДП індукують синтез IL-33 та IL-25 [15], які в свою чергу впливають на активність ILC2, що в результаті призводить до розвитку алергічних захворювань.

Вплив алергенів КДП тісно пов'язують з розвитком АР, бронхіальної астми та atopічного дерматиту [9]. Вважають, що кліщі роду *Dermatophagoides*, такі як *D. pteronyssinus* (*Der p*) і *D. farinae* (*Der f*) є найбільш важливими джерелами алергенів, пов'язаних з розвитком бронхіальної астми. На сьогодні відомо більше 30 білків, які продукують КДП, та які індукують синтез IgE у осіб з алергією [7]. Існують домінантні антигени, які відносять до груп алергенів 1 та 2, що можуть складати основну частину екстракту всіх алергенних білків КДП [8]. Серед алергенів *D. pteronyssinus* *Der p* 1 належить до сімейства папаїнподібних цистеїнових протеаз [15]. Вважають, що ця протеолітична активність приймає

участь в патогенезі алергії через збільшення проникливості епітеліальних клітин і забезпечує проходження їх власних і інших алергенів через епітелій [16]; а також шляхом впливу на функцію базофілів, опасистих клітин, альвеолярних макрофагів і епітеліальних клітин дихальних шляхів. Деякі автори вважають, що *Der p* 1 та інші *Der p* антигени здатні безпосередньо індукувати вивільнення прозапальних цитокінів і хемокинів із бронхіальних епітеліальних клітин людини [1].

Виходячи із вище сказаного, цікавим було б оцінити стан системного клітинного імунітету та оцінити їх функціональну активність за рівнем синтезу цитокінів у пацієнтів з різними формами АР, сенсibilізованих до КДП для з'ясування додаткових диференціальних критеріїв, що дозволять розмежувати IgE-залежну і IgE-незалежну форму захворювання, що в подальшому може стати мішенню для нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

### Об'єкт і методи дослідження

Під спостереженням знаходилося 60 осіб. Вік обстежених складав ( $28,6 \pm 2,4$ ) років, серед яких було 29 (48,3 %) жінок і 31 (51,7 %) чоловіків. Діагноз АР був встановлений на основі клінічних критеріїв і рекомендацій ARIA [5]. Дослідження проводилось відповідно до 7-го перегляду принципів Гельсінкської декларації прав людини (2013), Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України.

Критеріями включення були: наявність симптомів специфічних для АР, наявність сенсibilізації до КДП *D. pteronyssinus* та *D. farinae* за результатами шкірних тестів та результатами специфічних IgE в сироватці крові до екстрактів КДП та їх компонентів (*Der p* 1, 2) і (*Der f* 1, 2) відповідно; відсутність іншої алергічної патології та порушень функції носоглотки; вік пацієнтів — 20-60 років. Критеріями виключення були: хронічний риносинусит, наявність поліпів носа, неалергічний (інфекційний) риніт, вік молодше 20 і старше 60 років.

Тяжкість клініки АР оцінювали за допомогою шкали назальних симптомів: чхання, заложеність носа, ринорея, свербіння; оцінка 0 — відсутні, 1 — легкі, 2 — помірні, 3 — тяжкі, максимум до 12 балів.

Для дослідження хворі були розподілені на дві групи за рівнем загального IgE. I група (30 осіб) — особи з АР, рівень загального IgE в сироватці крові яких становив  $> 100$  kU/L, II група (30 осіб) — особи з АР, рівень загального IgE в сироватці крові яких становив  $< 100$  kU/L.

Контрольну групу склали 20 здорових осіб віком 20-60 років без ознак будь-яких алергічних захворювань та відсутньою патологією носоглотки.

Алергічну сенсibilізацію до КДП визначали за результатами шкірних прик-тестів, які виконували з екстрактами алергенів (Immunotek, Іспанія). Постановка

і оцінка їх результатів проводилась відповідно до європейських вимог [4].

Рівень загального IgE і специфічних IgE до компонентів алергенів (sIgE) визначали за допомогою колориметричного ферментного аналізу (Macro Array Diagnostic, ALEX, Австрія). Вміст алергенспецифічних IgE до компонентів алергенів оцінювали наступним чином: алерген не визначається або від'ємний ( $< 0,3$  kU/L, клас 0); рівень IgE низький (0,3-1 kU/L, клас 1), середній рівень IgE (1-5 kU/L, клас 2), високий рівень IgE (5-15 kU/L, клас 3), дуже високий рівень IgE ( $> 15$  kU/L, клас 4).

Оцінку концентрації цитокінів в сироватці крові визначали з використанням наборів — IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (IBL International, Німеччина). Оцінку результатів проводили за допомогою фотометра «Sunrise» (Австрія).

Для оцінки кількості лімфоцитів — CD3, CD4, CD8, CD19, CD 16+56 забір крові в хворого проводився натщесерце з вени в пробірки з K<sub>2</sub>EDTA («Becton Dickinson», США). У дві пробірки додавали по 50 мкл цільної крові пацієнта. У першу пробірку додали 5 мкл CD3/CD8/CD45/CD4 моноклональних антитіл («Beckman Coulter», США), у другу — 5 мкл CD3/CD16+56/CD45/CD19 моноклональних антитіл («Beckman Coulter», США). Зразки перемішували на вортексі та інкубували в темноті 15 хв при кімнатній температурі, уникаючи попадання прямого сонячного проміння. У кожну пробірку додавали 1 мл робочого лізуючого розчину («Beckman Coulter», США), перемішували на вортексі V-1 plus («Biosan», США) і інкубували в темноті 10 хв. при кімнатній температурі. Аналіз зразків проводили на проточному цитометрі EPICS (США).

Відсоток Трег-клітин (CD3+CD4+CD25+CD127low) визначали з використанням моноклональних антитіл: CD3-PerCP, CD4-APC, CD25-PECy7 і CD127-PE (BD, Biosciences). Фенотипування клітин проводили з використанням проточного цитометра EPICS (США). Гейтування Т-регуляторних клітин проводили за CD3+CD4+лімфоцитами.

Визначення спонтанної та індукованої продукції цитокінів мононуклеарами периферичної крові *in vitro* проводилося з використанням мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів з АР та контрольної групи. Виділення мононуклеарних клітин проводили з використанням стандартного розчину на градієнті фікол-верографіну (1,076–1,078). Для визначення цитокін-продукуючої здатності мононуклеари крові після виділення в стандартному градієнті щільності фікол-верографіну тричі відмивали в середовищі 199 і ресуспендували в культуральному середовищі RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, Німеччина), що містить 10 % ембріональної телячої сироватки, 400 мкг/мл гентаміцину,  $5 \times 10^{-5}$  М2-меркаптоетанолу і 2 мл 3 % L-глутаміну. Клітинну суспензію в концентрації  $1,5 \times 10^6$  кл/мл інкубували 24 години в CO<sub>2</sub>-

інкубаторі при 37° С без стимулюючого агента та в присутності фітогемаглютиніну (50 мкг/мл) (Sigma-Aldrich, Німеччина). По закінченні часу інкубації клітини осаджували центрифугуванням при 1600 об/хв протягом 10 хвилин, відбирали супернатанти і зберігали до тестування при –20° С. Вміст цитокінів у супернатантах визначали за допомогою імуноферментного методу, згідно методики запропонованої виробником. Оцінку концентрації цитокінів в сироватці крові визначали з використанням наборів для імуноферментного аналізу — IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (IBL International, Німеччина). Оцінку результатів проводили за допомогою фотометра «Sunrise» (Австрія).

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програм Microsoft Excel 2002, Statistica for Windows 6.0. Кількісні зміни представлені у вигляді медіани, середньоквадратичного відхилення (SD) та середнього арифметичного. Для перевірки розподілу на нормальність використовували тест Колмогорова-Смірнова. Для оцінки вірогідності отриманих результатів використовували *t*-критерій Стюдента. Відмінності вважали вірогідними при  $p < 0,05$ .

### Результати та їх обговорення

Для усіх пацієнтів, які були включені в дослідження, характерними були симптоми легкого, помірного та тяжкого АР. Серед обстежених пацієнтів у 45 (76 %) були скарги на періодичне/постійне чхання, у 39 (65,6 %) — ринорею, у 43 (73,0 %) — закладеність носа, у 37 (62,2 %) — свербіж носа. Загальна характеристика пацієнтів та результати лабораторних обстежень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1. Загальна характеристика пацієнтів з алергічним ринітом

| Параметри                            | Контрольна група<br>(n = 20)       | I група<br>(n = 30)                   | II група<br>(n = 30)               |
|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| Вік                                  | 42,4 ± 10,3<br>28,4<br>(25–52)     | 38,7 ± 5,1<br>27,9<br>(24–59)         | 45,4 ± 8,6<br>34,1<br>(23–54)      |
| Стать (ч/ж)                          | 11/9                               | 14/16                                 | 18/12                              |
| IgE, kU/L                            | 14,5 ± 5,8<br>16,4<br>(8,8 — 20,4) | 540,65 ± 124,68<br>294,5<br>(212–764) | 72,3 ± 26,15<br>35,94<br>(45–98)   |
| Еозинофіли крові,<br>абс. число, г/л | 0,15 ± 0,08<br>0,11<br>(0,07–0,23) | 0,79 ± 0,38<br>0,54<br>(0,32–0,98)    | 0,53 ± 0,11<br>0,38<br>(0,15–0,64) |

M ± m, SD: стандартне відхилення, Xmin — Xmax; \*\*  $p < 0,05$ .

Щодо рівня загального IgE (табл. 1), за яким пацієнти були розділені на групи, було показано, що у пацієнтів I групи цей показник був значно підвищений і коливався від 212 kU/L до 764 kU/L і в середньому становив 294,5 kU/L, проти (14,5 ± 5,8) kU/L в контрольній групі. У пацієнтів II групи рівень загального IgE коливався в



межах 45-98 kU/L і в середньому становив 35,9 kU/L. При оцінці рівня еозинофілів було встановлено вірогідне підвищення їх рівня у пацієнтів I і II групи ( $0,79 \pm 0,38$  г/л і  $0,53 \pm 0,11$  г/л відповідно, що вірогідно відрізнялось від показників контрольної групи ( $0,15 \pm 0,08$  г/л,  $p < 0,01$ ). Однак при порівнянні числа еозинофілів між I і II групою вірогідних відмінностей його рівня виявлено не було.

Аналіз стану показників клітинної ланки імунної системи у осіб з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР представлений на рис. 1. Згідно проведених нами досліджень було встановлено, що у групі осіб з IgE-залежною формою АР загальна кількість CD3+ Т-лімфоцитів у відсоткових значеннях практично не відрізнялась від значень у групі контрольних осіб, а тенденцію зниження їх кількості виявлено лише у абсолютних значеннях. Водночас серед субпопуляцій Т-лімфоцитів відмічали певний дисбаланс у співвідношенні CD4+Т-лімфоцитів-хелперів і CD8+Т-лімфоцитів-супресорів/цитотоксичних. Однак у абсолютних значеннях вірогідних відмінностей також виявлено не було. Кількість CD8+-лімфоцитів була зниженою лише у відсоткових значеннях. Зміна співвідношення Т-лімфоцитів-хелперів та Т-лімфоцитів-супресорів/цитотоксичних відображена у підвищенні імунорегуляторного індексу CD4/CD8.

При оцінці аналогічних показників у групі осіб з IgE-незалежною формою АР також виявлено незначне підвищення числа CD4+Т-лімфоцитів-хелперів та зниження CD8+-лімфоцитів у відсоткових значеннях, однак у абсолютних значеннях вірогідних відмінностей також виявлено не було. Щодо кількості CD19 В-лімфоцитів та CD16+56 НК-лімфоцитів, то зниження кількості CD19 було встановлено лише у групі пацієнтів з IgE-залежною формою АР, а кількість CD16+56 НК-лімфоцитів вірогідно не відрізнялась від показників контрольної групи. При порівнянні отриманих результатів досліджень за кількістю між двома групами пацієнтів з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР вірогідних відмінностей їх кількості виявлено не було.

Однак при оцінці кількості CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> Трег лімфоцитів було виявлено їх зниження у групі осіб з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ ). При цьому зниження кількості цих клітин було зафіксовано не тільки у відсоткових, а і у абсолютних значеннях. Тоді як в групі з IgE-незалежною формою АР вірогідного зниження рівня Трег лімфоцитів виявлено не було.

На сьогодні відомо, що в розвитку АР імунорегуляторну роль відіграє баланс між Th1 і Th2 лімфоцитами. Регуляторну роль Th1 оцінювали за синтезом IL-2 та  $\gamma$ -ІФН. Результати проведених досліджень представлені на рис 2. Так рівень IL-2 був вірогідно зниженим у пацієнтів двох дослідних груп ( $p < 0,05$ ). Оцінка рівня  $\gamma$ -ІФН показала вірогідне його зниження лише у пацієнтів I групи у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ). При порівнянні рівня цитокінів між I і II групами вірогідних відмінностей за рівнем цих цитокінів виявлено не було.

Маркерами Th2 типу імунної відповіді слугували IL-4, IL-5 та IL-13 (рис. 3). При проведенні аналізу отриманих результатів було показано, що рівень IL-4 був вірогідно вищим контрольних значень ( $p < 0,05$ ). Причому вірогідне підвищення його рівня було характерним лише для пацієнтів I групи. Оцінка рівня IL-5 показала вірогідне його підвищення у пацієнтів обох груп ( $p < 0,01$ ). При оцінці рівня IL-13 підвищення його рівня було також характерним для двох дослідних груп. Однак у пацієнтів I групи зафіксовано збільшення його синтезу майже у 3 рази до ( $61,22 \pm 8,12$ ) пг/мл, тоді як у пацієнтів II групи його рівень був майже у 5 разів вищим і становив ( $93,4 \pm 3,82$ ) пг/мл у порівнянні з контролем ( $p < 0,001$ ). Цікавим виявився той факт, що при порівнянні рівня синтезу цитокінів між двома групами пацієнтів було встановлено вірогідне підвищення лише рівня IL-13 у пацієнтів II групи ( $p < 0,001$ ).

Іншу підгрупу Т-лімфоцитів представляють Трег, які здійснюють супресивний вплив на розвиток запалення, опосередкованого Th1 і Th2 лімфоцитами. Відомо, що як кількісна, так і функціональна недостатність Трег викликає розвиток алергічного запалення поряд з підвищенням Th2 лімфоцитів. Трег контролю-

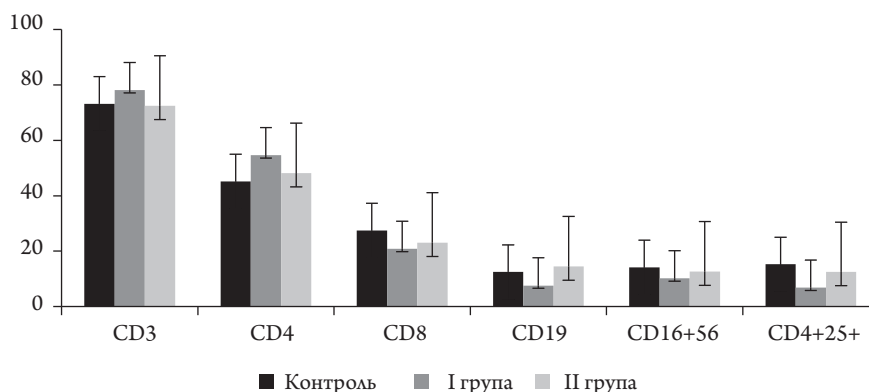


Рис. 1. Кількість лімфоцитів в периферичній крові у пацієнтів з АР та сенсibiлізацією до кліщів домашнього пилу.

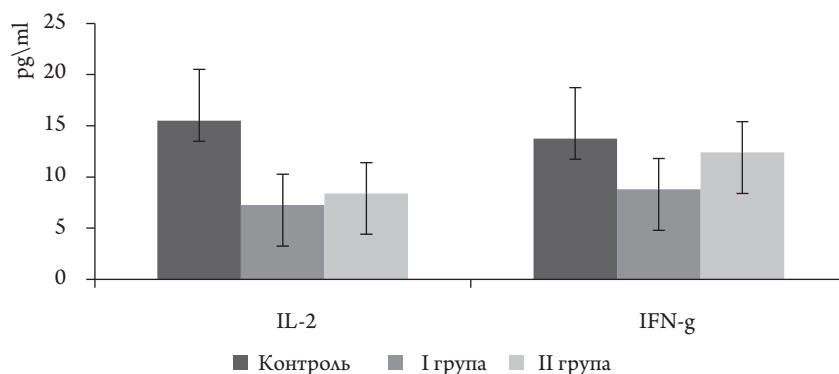


Рис. 2. Рівень сироваткових цитокінів, що продукуються Т-хелперами I типу.

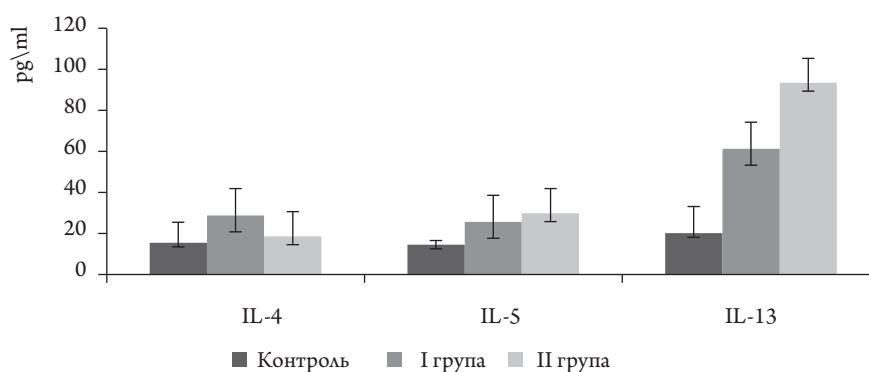


Рис. 3. Рівень сироваткових цитокінів, що продукуються Т-хелперами II типу.

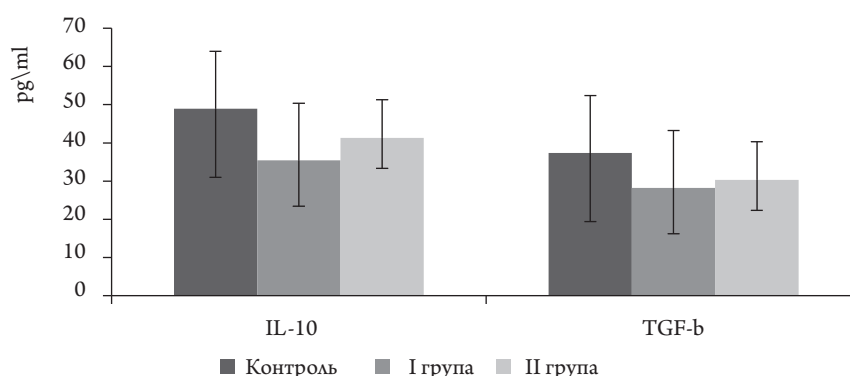


Рис. 4. Рівень сироваткових цитокінів, що продукуються Т-лімфоцитами регуляторними.

ють алергічне запалення шляхом синтезу IL-10 і трансформуючого фактора росту (TGF- $\beta$ ). В результаті проведеного нами дослідження (рис. 4) було встановлено вірогідне зниження рівня IL-10 як у пацієнтів I групи, так і пацієнтів II групи у порівнянні з контролем ( $p < 0,01$ ). Причому у пацієнтів I групи ці зміни були більш вираженими. При оцінці рівня TGF- $\beta$  було встановлено зниження його рівня лише у пацієнтів I групи. При порівнянні цих показників між двома обстежуваними групами вірогідну відмінність було виявлено за рівнем IL-10.

Враховуючи попередні дані метою нашого дослідження було оцінити цитокінпродукуючу активність мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів з АР, сенсibilізованих до КДП, для з'ясування додаткових диференційних критеріїв, що дозволять розмежувати

IgE-залежну і IgE-незалежну форму захворювання. Нами були проведені дослідження *in vitro* стану імунітету у хворих з різними формами АР з вивченням функціональної активності клітин Т-хелперів I типу — за продукцією IL-2 і IFN- $\gamma$ ; Т-хелперів II типу — за продукцією IL-4, IL-5, IL-13; а також Treg-лімфоцитів периферичної крові пацієнтів за їх здатністю продукувати IL-10 і TGF- $\beta$ . Дані щодо спонтанної (Сп) та мітогенактивованої (Ін) продукції цитокінів, які синтезуються Th1 лімфоцитами в супернатантах клітин крові, отриманих у здорових осіб і хворих на IgE-залежну і IgE-незалежну форму АР, представлені в таблиці 2.

В результаті проведеного нами дослідження встановлено, що у групі хворих з IgE-залежною формою АР спостерігається зниження продукції цитокінів, які продукуються Th1 лімфоцитами, а саме IL-2, IFN- $\gamma$ , посилення

Таблиця 2. Продукція цитокінів мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro*

| Форма АР                      | IL-2,<br>pg/ml |                  | IFN- $\gamma$ ,<br>pg/ml |                 | IL-4,<br>pg/ml  |                   | IL-5,<br>pg/ml   |                     | IL-13,<br>pg/ml   |                     | IL-10,<br>pg/ml  |                   | TGF- $\beta$ ,<br>pg/ml |                  |
|-------------------------------|----------------|------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|------------------|-------------------|-------------------------|------------------|
|                               | Сп             | Ін               | Сп                       | Ін              | Сп              | Ін                | Сп               | Ін                  | Сп                | Ін                  | Сп               | Ін                | Сп                      | Ін               |
| Контроль-на група<br>(n = 20) | 25,8 $\pm$ 1,3 | 43,8 $\pm$ 2,6   | 16,4 $\pm$ 0,6           | 46,5 $\pm$ 3,5  | 35,7 $\pm$ 6,5  | 75,4 $\pm$ 5,8    | 26,8 $\pm$ 2,2   | 65,8 $\pm$ 6,3      | 40,7 $\pm$ 2,9    | 91,6 $\pm$ 3,8      | 116,9 $\pm$ 11,2 | 558,7 $\pm$ 15,6  | 79,53 $\pm$ 3,2         | 105,6 $\pm$ 13,5 |
| I група<br>(n = 30)           | 18,8 $\pm$ 1,5 | 23,7 $\pm$ 0,9*  | 10,4 $\pm$ 0,8*          | 29,5 $\pm$ 2,5* | 69,4 $\pm$ 7,2* | 125,6 $\pm$ 13,3* | 78,3 $\pm$ 8,4*  | 205,5* $\pm$ 15,4   | 80,3 $\pm$ 16,1*  | 142,7 $\pm$ 12,8*   | 98,5 $\pm$ 8,4   | 589,4 $\pm$ 12,5* | 63,3 $\pm$ 1,4*         | 86,1 $\pm$ 11,7  |
| II група<br>(n = 30)          | 23,5 $\pm$ 1,6 | 38,6 $\pm$ 1,2** | 17,4 $\pm$ 2,1**         | 34,5 $\pm$ 4,2* | 48,4 $\pm$ 6,5  | 98,6 $\pm$ 7,3*** | 32,4 $\pm$ 1,9** | 139,3 $\pm$ 14,4*** | 68,8 $\pm$ 5,4*** | 184,4 $\pm$ 13,1*** | 108,8 $\pm$ 8,3  | 535,4 $\pm$ 14,6  | 174,6 $\pm$ 11,6**      | 218,6 $\pm$ 15,2 |

\* — вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ );

\*\* — вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ ).

продукції IL-4, IL-5, IL-13, тобто цитокінів, що продукуються Th2 лімфоцитами. Порушення дисбалансу між Th1/Th2 лімфоцитами супроводжувалось зниженням продукції супресивних цитокінів IL-10 і TGF- $\beta$ . Таким чином, у даних групах хворих на АР спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції *in vitro* цитокінів клітинами, що призводить до розвитку алергічного запалення та посилення синтезу IgE.

У групі хворих з IgE-незалежною формою АР, на відміну від IgE-незалежної, спостерігався дисбаланс синтезу цитокінів Th1 і Th2 лімфоцитами. Однак вірогідних змін рівня IFN- $\gamma$  встановлено не було. Спостерігалась така ж сама тенденція до зміни рівня Th2 цитокінів, однак значення їх показників були дещо нижчими. Цікавим виявилось те, що у групі хворих з IgE-залежною формою АР спостерігали достовірне зниження показників спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro*, тоді як у хворих з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищення рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

Таким чином, в результаті проведених нами досліджень було встановлено зниження кількості CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> Т регуляторних лімфоцитів лише у групі осіб з IgE-залежною формою АР. У пацієнтів з IgE-залежною формою АР, на відміну від IgE- незалежної форми АР, спостерігається вірогідне зниження показників як IL-10, так і TGF- $\beta$ . Отримані результати можуть свідчити про те, що недостатність функціональної активності цих

клітин сприяє як поляризації імунної відповіді в сторону Th2 лімфоцитів, так і посиленню синтезу цитокінів ILC2 клітинами, що в результаті призводить до розвитку алергопатології.

### Висновки

Дослідження проведенні в умовах *in vitro* підтвердили наші припущення про відмінність імунної відповіді на алерген у пацієнтів з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР. У пацієнтів з IgE-залежною формою розвиток алергічного запалення відбувається за участі відповіді Th2 лімфоцитів, яка відображається в значно підвищених рівнях експресії IL-4, IL-5 і IL-13, що в подальшому призводить до розвитку синтезу IgE. Посилення синтезу цих цитокінів зумовлене зниженням кількості Treg лімфоцитів, що і відображається у зниженні синтезу як IL-10, так і TGF- $\beta$ . У пацієнтів з IgE-незалежною формою АР такої чіткої відповіді Th2 та Treg лімфоцитів не спостерігається, що очевидно може свідчити про активацію інших патогенетичних шляхів та залученням інших імунокомпетентних клітин та цитокінів у імунну відповідь на алерген. Отже, розвиток алергічного запалення у пацієнтів з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР з сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу відбувається різними шляхами. Отримані результати потребують подальшого дослідження, що може стати мішенню для нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

## FEATURES OF THE IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH PERENNIAL ALLERGIC RHINITIS WITH SENSITIZATION TO HOUSE DUST MITES

S. D. Yuriev, A. I. Kurchenko

O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

**Abstract.** The aim of the study was to evaluate the features of the immune response in patients with allergic rhinitis (AR) sensitized to house dust mites.

**Materials and methods.** The study included 60 patients with AR aged 20–60 years. According to the level of total IgE (IgE > 100 kU/L), patients were divided into two groups with IgE-dependent and IgE-independent form of AR. All patients were tested for CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16+56, CD4+CD25+ and cytokines IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Evaluation of cytokine synthesis was performed *in vivo* and *in vitro*.

**Results of the research.** According to our data, both in patients with IgE-dependent and in patients with IgE-independent form of AR was found an increase in the number of CD3+CD4+ T-lymphocyte helpers only in percentage values. However, no significant differences in T-lymphocyte helpers counts between the two groups of patients with different forms of AR were found. Decreases in B-lymphocyte counts were observed only in patients with IgE-dependent AR. Significant differences in the number of NK cells between the group of people with IgE-dependent and IgE-independent form of AR were also not detected. A decrease in the number of T-regulatory lymphocytes was found only in the group of people with IgE-dependent form of AR. Patients with IgE-dependent form of AR were characterized by a decrease in the level of T-lymphocytes helpers I type (Th1) cytokines IL-2 and  $\gamma$ -IFN, an increase in the level of T-lymphocytes helpers II type (Th2) cytokines — IL-4, IL-5 and IL-13, and a decrease cytokines by T regulatory cells — IL-10 and TGF- $\beta$ . At the same time, a probable decrease in the level of the suppressive cytokine IL-10 was found in comparison with the group of patients with IgE-independent form of AR. Patients with the IgE-independent form were characterized by only elevated IL-13 levels. *In vitro* studies have shown that in patients with IgE-dependent form, the development of allergic inflammation occurs with the participation of Th2 lymphocyte response, which was reflected in significantly increased levels of expression of IL-4, IL-5 and IL-13, and decreased IL synthesis — 2, IFN- $\gamma$ . Increased synthesis of these cytokines was due to a decrease in the number of T-regulatory lymphocytes, which was reflected in a decrease in the synthesis of both IL-10 and TGF- $\beta$ . In patients with IgE-independent form of AR, such a clear response of Th2 and T-regulatory lymphocytes was not observed, which may indicate the activation of other pathogenetic pathways and the involvement of other immunocompetent cells and cytokines in the immune response to the allergen.

**Conclusions.** Thus, our results show that the development of allergic inflammation in the group of patients with IgE-dependent and IgE-independent forms of AR with sensitization to house dust mites can occur in different ways. The obtained results require further research, which may further be a basis for development of new approaches to treatment and evaluation of the effectiveness of AR treatment.

**Key words:** allergic rhinitis, house dust mites, immune response, regulatory T lymphocytes, cytokines.

## ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С КРУГЛОГОДИЧНЫМ АЛЛЕРГИЧЕСКИМ РИНИТОМ И СЕНСИБИЛИЗАЦИЕЙ К КЛЕЩАМ ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ

С. Д. Юрьев, А. И. Курченко

Национальный медицинский университет им. О. О. Богомольца, Киев, Украина

**Резюме.** Целью исследования было оценить особенности иммунного ответа у больных аллергическим ринитом (АР), сенсibilизированных к клещам домашней пыли.

**Материалы и методы.** В исследование было включено 60 пациентов с АР в возрасте 20–60 лет. По уровню общего IgE (IgE > 100 kU/L) пациентов разделили на две группы: с IgE-зависимой и IgE-независимой формами АР. Всем пациентам проводили определение количества CD3+CD4+, CD3+CD8+, CD19+, CD16+56, CD4+CD25+ и уровня цитокинов IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Продукцию цитокинов оценивали в условиях *in vivo* и *in vitro*.

**Результаты исследования.** Согласно полученным данным как у пациентов с IgE-зависимой, так и у пациентов с IgE-независимой формой АР установлено повышение количества Т-лимфоцитов хелперов только в процентных значениях. Однако достоверных отличий по количеству Т-лимфоцитов хелперов между двумя группами пациентов с разными формами АР установлено не было. Снижение количества В-лимфоцитов было отмечено только у пациентов с IgE-зависимой формой АР. Достоверных различий в количестве НК-клеток между группой людей с IgE-зависимой и IgE-независимой формой АР также не обнаружено. Снижение количества Т-регуляторных лимфоцитов обнаружено только в группе людей с IgE-зависимой формой АР. Пациенты с IgE-зависимой формой АР характеризовались снижением уровня цитокинов Т-лимфоцитами хелперами I типа (Th1) — IL-2 и  $\gamma$ -IFN, повышением уровня цитокинов Т-лимфоцитами хелперами II типа (Th2) — IL-4, IL-5 и IL-13 и снижением синтеза цитокинов Т-регуляторными клетками — IL-10 и TGF- $\beta$ . При этом выявлено вероятное снижение уровня супрессивного цитокина IL-10 по сравнению с группой больных IgE-независимой формой АР. Пациенты с IgE-независимой формой характеризовались только повышенным уровнем IL-13. Исследования, проведенные в условиях *in vitro*, показали, что у пациентов с IgE-зависимой формой развитие аллергического воспаления происходит с участием ответа Th2 лимфоцитов, который отражался в значительно повышенных уровнях экспрессии IL-4, IL-5 и IL-13, а также снижении синтеза IL-2, IFN- $\gamma$ . Усиление синтеза этих цитокинов было обусловлено снижением количества лимфоцитов Т-регуляторных, что и отражалось снижением синтеза как IL-10, так и TGF- $\beta$ . У пациентов с IgE-независимой формой АР такого четкого ответа Th2 и Т-регуляторных лимфоцитов не наблюдали, что, очевидно, может свидетельствовать об активации других патогенетических путей и вовлечении других иммунокомпетентных клеток и цитокинов в иммунный ответ на аллерген.

**Выводы.** Полученные нами результаты показывают, что развитие аллергического воспаления в группе пациентов с IgE-зависимой и IgE-независимой формами АР с сенсibilизацией к клещам домашней пыли может происходить по-разному. Полученные результаты требуют дальнейших исследований, которые могут стать основой для разработки новых подходов к лечению и оценке эффективности лечения АР.

**Ключевые слова:** аллергический ринит, клещи домашней пыли, иммунный ответ, регуляторные Т-лимфоциты, цитокины.

## ЛІТЕРАТУРА/REFERENCES

- Asokanathan N, Graham PT, Stewart DJ, et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunology*. 2002;15;169(8):4572–4578. DOI: 10.4049/jimmunol.169.8.4572.
- Bart N, Lambrecht, Hamida Hammad. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. 2014;134:499–507. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.06.036.
- Bayrak P, Degirmenci, Aksun S, et al. Allergic Rhinitis and Its Relationship with IL-10, IL-17, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL 22, and IL-35. *Hindawi Disease Markers*. 2018:1–6. DOI: 10.1155/2018/9131432.
- Bousquet J, Heinzelberg L, Bachert C. Practical Guide To Skin Prick Tests In Allergy To Aeroallergens. *Allergy*. 2012;67(1):18–24. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x.
- Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN and AllerGen). *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2008;63(8):8–160. doi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
- Gérard Eberl, Marco Colonna, James P Di Santo, Andrew NJ McKenzie. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. *Science*. 2015;22;348:6237. DOI: 10.1126/science.aaa6566.
- González-Pérez R, Pineda F, Poza-Guedes P, et al. Molecular allergen profiling of dual mite sensitization in severe allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2020;30(6):421–429. doi: 10.18176/jiaci.0439.
- Ignacio J. Ansotegui, Giovanni Melioli, Giorgio Walter Canonica. A WAO—ARIA—GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organization Journal*. 2020;139(2):P.1–467. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2019.100091>.
- J De Alba, Raemdonck K, Dekkak A. House dust mite induces direct airway inflammation in vivo: implications for future disease therapy? *Eur Respir J*. 2010;35:1377–1387. DOI: 10.1183/09031936.00022908.
- Martin-Orozco E, Norte-Muñoz V, Martínez-García J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma *Front Pediatr*. 2017;5:117. DOI: 10.3389/fped.2017.00117.
- Novak N, Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;112:252–62. doi: 10.1067/mai.2003.1595.
- Pawankar R, Ra C. Heterogeneity of mast cells and T cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98:248–262. DOI: 10.1159/000053700.
- Stephen J Galli, Mindy Tsai. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2012;18(5):693–704. DOI: 10.1038/nm.2755.
- Sun R, Yang Y, Huq Q. Increased expression of type 2 innate lymphoid cells in pediatric patients with allergic rhinitis. *Exp Ther Med*. 2020;19(1):735–740. DOI: 10.3892/etm.2019.8235.
- Takai T, Kato T, Sakata Y. Recombinant Der p 1 and Der f1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328:944–952. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.01.051.
- Yong Hyun Jang, Jin Kyeong Choi, Meiling Jin, Young-Ae Choi, Zae Young Ryoo, Hyun-Shik Lee, et al. House Dust Mite Increases pro-Th2 Cytokines IL-25 and IL-33 via the Activation of TLR1/6 Signaling. *Journal of Investigative Dermatology*. 2017;137(11):2354–2361. DOI: 10.1016/j.jid.2017.03.042.

## Відомості про авторів

## С. Д. Юр'єв\*

Аспірант кафедри клінічної імунології та алергології з курсом медичної генетики  
Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця  
47, вул. Волоська, м. Київ, 04070, Україна,  
E-mail: yuriev@gmail.com  
ORCID ID: orcid.org/0000-0003-4323-7967

## А. І. Курченко

Доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри клінічної імунології та алергології з курсом медичної генетики  
Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця  
47, вул. Волоська, м. Київ, 04070, Україна,  
E-mail: andriy.kurchenko@gmail.com  
ORCID ID: orcid.org/0000-0001-6858-2025

## Information about authors

## SD Yuriev\*

Postgraduate student of the Department of Clinical Immunology and Allergology with Medical Genetics Section  
O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine  
47, Voloska str Kyiv, 04070, Ukraine  
E-mail: yuriev@gmail.com

## AI Kurchenko

PhD in Medicine, Professor, Head of the Department of Clinical Immunology and Allergology with Medical Genetics Section  
O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine  
47, Voloska str Kyiv, 04070, Ukraine  
E-mail: andriy.kurchenko@gmail.com

Надійшла до редакції / Received: 06.02.2022 р.  
Прийнято до друку / Accepted: 16.02.2022 р.