

На правах рукописи

СМИРНОВ

Дмитрий Сергеевич

РОЛЬ ИЗОФОРМ МОЛЕКУЛЫ FOXP3 В РЕГУЛЯЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ
ПРИ ПОЛЛИНОЗЕ И ПРОГНОЗЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АЛЛЕРГЕН-
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ

14.03.09 – клиническая иммунология, аллергология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва, 2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России (ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России)

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Донецкова Альмира Дмитриевна

Официальные оппоненты:
Ненашева Наталья Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой аллергологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская академия непрерывного профессионального образования»

Зайцева Ольга Витальевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой педиатрии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2020 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 208.017.01 в ФГБУ «ГНЦ «Института иммунологии» ФМБА России» по адресу:
(115478, Москва, Каширское шоссе, 24)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России и на сайте:

<http://nrcii.ru/dissertatsionnyysovet/zashchity-dissertatsiy/>

Автореферат разослан «_____» _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Гудима Г.О.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Бронхиальная астма (БА) и аллергические заболевания (АЗ) в целом являются одной из основных причин нетрудоспособности наиболее молодых и деятельных слоев населения, снижения качества жизни и крупных финансовых затрат на лечение и реабилитацию больных. Аллергический ринит (АР) является фактором риска развития БА (Cruz A.A., 2007). АР в нашей стране страдает от 12,7 до 24% населения, при этом уровень заболеваемости неуклонно растет (Хаитов Р.М., Ильина Н.И., 2009). Актуальным является изучение иммунологических механизмов развития аллергических заболеваний, разработки эффективных методов их лечения и профилактики. Показано, что поддержание иммунологического баланса определяется взаимодействиями между дендритными клетками, эффекторными клетками и регуляторными Т-клетками (Treg). Нарушение этого равновесия, вероятно, играет значимую роль в развитии заболеваний иммунной системы, в т.ч. и АЗ. Тем не менее, роль как эффекторных клеток, так и Treg в развитии АЗ определена неполно.

Основным транскрипционным фактором, определяющим дифференцировку и функционирование Treg, является *FOXP3*. Следствием мутаций гена *foxp3* и вызываемого ими дефицита Treg является развитие летального аутоиммунного процесса с вовлечением различных органов и тканей, развитием кахексии, тяжелого иммунодефицита, лимфопролиферации, аллергических проявлений (IPEX-синдром). В то же время, ряд исследований, посвященных изучению механизмов развития патологии иммунной системы и АЗ, не выявил изменений в содержании Treg и FOXP3. Это наводит на мысль, что причина данных заболеваний скрыта не в количестве, а в структурной организации молекулы FOXP3, напрямую связанной с ее функциональной активностью.

Одним из ведущих патогенетических методов лечения АЗ является метод аллерген-специфической иммунотерапии (АСИТ). Однако механизмы высокой эффективности данного метода лечения и формирования толерантности к воздействию аллергенов до сих пор полностью не раскрыты. Учитывая потенциальную роль Treg в ограничении иммунного ответа, естественно предположить, что иммунологические механизмы эффективности АСИТ связаны с воздействием на Treg.

Исходя из вышеизложенного, а также опираясь на данные предшествующих исследований экспрессии изоформ молекулы FOXP3 при различных иммунопатологических состояниях, актуальным направлением иммунологии является изучение экспрессии изоформ молекулы FOXP3 Т-хелперами при аллергических заболеваниях. Так как наиболее изученным классическим атопическим IgE-зависимым АЗ является поллиноз, то целесообразно начать следующий, иммуногенетический этап исследований АЗ именно с изучения данной патологии. Поскольку АСИТ способствует формированию иммунологической толерантности к аллергенам и можно предположить существование взаимосвязи ее формирования с изменениями экспрессии изоформ молекулы FOXP3, целесообразно исследовать экспрессию изоформ молекулы FOXP3 CD4⁺-Т-клетками и мононуклеарами периферической при поллинозе в различные стадии заболевания, а также оценить влияние АСИТ на исследуемые показатели.

Цель исследования

Изучить динамику экспрессии молекулы FOXP3 и ее изоформ у больных поллинозом и определить их регуляторную функцию и прогностическую ценность в различные стадии заболевания и при аллерген-специфической иммунотерапии.

Задачи исследования

1. Изучить особенности экспрессии молекулы FOXP3 и ее изоформ, лишенных и содержащих продукт экзона 2, в CD4⁺T-клетках периферической крови пациентов, страдающих поллинозом, в различные стадии болезни – исходно, при постановке диагноза, по окончании первого курса АСИТ причинно-значимыми аллергенами и после сезона палинации, следующего за курсом лечения.

2. Провести анализ и интерпретировать данные исследования уровня экспрессии мРНК транскрипционных факторов Т-хелперов (*GATA3*, *TBX21* и *RORC*) у больных поллинозом в трех временных точках - до АСИТ, после проведения первого курса АСИТ и по окончании сезона пыления причинно-значимых растений, следующего после курса лечения.

3. Сопоставить данные клинической эффективности проведенного лечения с исходными характеристиками транскрипционных факторов Т-лимфоцитов у группы пациентов, страдающих поллинозом, и их динамикой после аллерген-специфической иммунотерапии и после сезона пыления причинно-значимых растений

4. Определить роль экспрессии молекулы FOXP3 и ее изоформ в лимфоцитах периферической крови в реализации механизма формирования толерантности при аллерген-специфической иммунотерапии у больных поллинозом.

5. Определить информационную ценность изучения молекулы FOXP3 и ее изоформ в лимфоцитах периферической крови пациентов, страдающих поллинозом, для прогнозирования эффективности АСИТ до начала лечения и выявления кандидатов с потенциальным положительным ответом на данное терапевтическое воздействие.

Научная новизна работы

Впервые исследована экспрессия изоформ молекулы FOXP3 CD4⁺-Т-клетками и мононуклеарами при поллинозе, до и после АСИТ, внесён существенный вклад в понимание патогенеза аллергического воспаления.

Впервые соотнесены молекулярные показатели эффективности АСИТ с известной схемой регуляции иммунного ответа у пациентов с поллинозом: изучена экспрессия транскрипционных факторов *GATA3*, *TBX21* и *RORC* в корреляции с экспрессией изоформ молекулы FOXP3 в CD4⁺-Т-лимфоцитах периферической крови пациентов с поллинозом.

Впервые определена роль экспрессии изоформ молекулы FOXP3 в Т-хелперах периферической крови в реализации механизма АСИТ у больных поллинозом с сенсibilизацией к аллергенам из пыльцы деревьев, заключающаяся в уменьшении доли FOXP3-FL Treg среди CD4⁺-Т-клеток (или относительное накопление FOXP3Δ2 Treg), особенно выраженное по окончании сезона палинации, что свидетельствует об усилении функциональной активности Treg и подтверждает длительный противовоспалительный эффект АСИТ.

Научно-практическая значимость работы

Исследование экспрессии изоформ молекулы FOXP3 позволило дополнить существующие представления о механизмах формирования толерантности к пыльцевым аллергенам при АСИТ, что поможет в дальнейшем индивидуализировать подходы к выбору пациентов для проведения АСИТ.

Изучение экспрессии изоформ молекулы FOXP3 в CD4⁺-Т-клетках даст возможность на этапе обследования выделить прогностически благоприятный контингент пациентов с предполагаемой высокой эффективностью АСИТ. Это позволит существенно повысить степень эффективности АСИТ, а остальным пациентам своевременно рекомендовать

какой-либо другой вид современной фармакотерапии. Предложенное определение экспрессии изоформ молекулы FOXP3 также может быть использовано для контроля эффективности проводимой АСИТ со своевременной её коррекцией при необходимости.

По результатам проведенного исследования получен Патент №2700788 «Способ оценки эффективности проведения аллерген-специфической иммунотерапии при аллергическом рините».

Представленные материалы могут быть использованы в образовательном процессе для студентов медицинских вузов, в учебных программах повышения квалификации на факультетах последипломного образования по вопросам клинической иммунологии, аллергологии, пульмонологии, оториноларингологии и в практическом здравоохранении.

Апробация работы

Материалы диссертации апробированы на заседании секции №3 Ученого совета ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (20 января 2020 г.)

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на следующих Всероссийских и международных конгрессах, конференциях и симпозиумах: Всероссийской Конференции «Клиническая иммунология и аллергология – практическому здравоохранению» (28 февраля 2018 г., г. Москва), Научно-практической конференции и Третьей школе по пыльцевой аллергии с международным участием «Традиционные и инновационные направления диагностики и лечения аллергии» (28 июня 2018 г., г. Саратов), IV Российском конгрессе лабораторной медицины (4 октября 2018 г., г. Москва), EAACI Digital Congress 2020 (06-08 июня 2020г)

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 107 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы. Библиографический указатель включает 142 источника, в том числе 20 отечественных и 122 зарубежных. Работа содержит 12 таблиц и 6 рисунков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническим объектом для комплексного углубленного исследования явились пациенты с поллинозом, обусловленным сенсibilизацией к аллергенам пыльцы деревьев, которые прошли обследование и лечение на базе отделения «Бронхиальная астма» ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России.

Анкетировано 117 пациентов с сенсibilизацией к аллергенам из пыльцы деревьев, из них отобрано в соответствии с критериями включения/исключения 38 пациентов, страдающих сезонным аллергическим ринитом или риноконъюнктивитом (АР/АРК) с сенсibilизацией к аллергенам из пыльцы деревьев, диагностируемым на протяжении как минимум двух последних лет вне зависимости от наличия у них бронхиальной астмы (БА). Диагноз подтверждался анамнезом и положительными скарификационными тестами с пыльцевыми аллергенами. Скрининг пациентов осуществлялся вне сезона палинации. Для проведения АСИТ случайным образом из 38 больных поллинозом было отобрано 19 пациентов – первая группа (10 мужчин, 9 женщин, медиана возраста 33 (28-46) года), по возрасту и полу соответствующих группе сравнения. Им был проведен 1 курс АСИТ классическим методом водно-солевыми экстрактами из смеси пыльцы деревьев («Микроген») подкожно по ускоренной схеме до

суммарной дозы аллергена не менее 6000 PNU. Вторую группу составили 19 пациентов с поллинозом (13 мужчин и 6 женщин), которым АСИТ не проводилась, медиана возраста 32,5 (26-46). В группу сравнения вошли 24 здоровых донора – 16 мужчин, 8 женщин, медиана возраста 33 (24-50) года.

Критерии включения: 1. Пациенты обоего пола должны быть ≥ 18 лет и ≤ 70 лет. 2. Ощущения пациента, соответствующие активности заболевания, должны достигать 50 мм на визуальной аналоговой шкале (ВАШ) в 100 мм. 3. Пациенты должны иметь величину ОФВ1 или ПСВ $> 80\%$ от прогнозируемой нормы. 4. Пациенты должны жаловаться на симптомы аллергического ринита и/или риноконъюнктивита, проявляющиеся в течение, как минимум, 2-х лет, с интермиттирующей астмой или без нее, вызванных клинической сенсibilизацией к пыльце деревьев. 5. IgE-опосредованная сенсibilизация должна быть подтверждена: историей болезни и положительным кожным тестированием с использованием водно-солевых растворов аллергенов из пыльцы деревьев.

Специальные критерии для пациентов с другими аллергическими симптомами: 1. Пациент не имеет типичных симптомов, вызванных сопутствующими аллергенами. 2. Пациенты с аллергией на эпителий животных могут быть включены в исследование, но не должны подвергаться воздействию специфического аллергена.

Критерии исключения: 1. Симптомы в результате сенсibilизации к другим аллергенам. 2. Острые или хронические воспалительные или инфекционные заболевания дыхательных путей. 3. Хронические обструктивные заболевания легких. 4. Заболевания иммунной системы, включая аутоиммунные заболевания и иммунодефицитные состояния. 5. Любое заболевание, при котором запрещается использование адреналина. 6. Любые злокачественные заболевания в течение последних 5-и лет. 7. Серьезные психические, нервные или неврологические расстройства.

8. Применение иммунотерапии против пыльцы деревьев с аналогичными экстрактами в течение последних 5-и лет. 9. Местное и системное лечение с применением β -блокаторов. 10. Прием кортикостероидов общего действия в течение 3-х месяцев. 11. Кормящие грудью женщины или беременные женщины.

Для выполнения поставленных в работе цели и задач были использованы следующие методы обследования: скрининг-анкетирование по специально разработанным анкетам; стандартные клинико-лабораторные обследования, функциональные, инструментальные исследования, аллергологическое и иммунологическое обследование (методами ПЦР в реальном времени, проточной цитофлуориметрии).

Аллергологическое обследование включало сбор аллергологического, фармакологического, пищевого анамнеза, кожные тесты с атопическими аллергенами, определение общего, специфических IgE и провокационные назальные тесты по показаниям.

Материалом для иммунологических исследований служила периферическая кровь. Забор крови производили в пробирки с антикоагулянтом (K_3EDTA в концентрации 2 мг/мл). Клетки подсчитывали на гемоанализаторе по общепринятой методике. Разделение клеточных элементов крови проводили путем центрифугирования в одноступенчатом градиенте плотности фиколла-верографина (плотность 1,077 г/мл) по методу Воуит А. Выделение мононуклеаров периферической крови (МНПК) и последующий анализ выполняли в течение последующих 6 ч.

Для определения мРНК генов *GATA3*, *TBX21*, *RORC* и *FOXP3* проводили ПЦР в режиме «реального времени» с обратной транскрипцией.

Выделение РНК из $5 \cdot 10^5$ клеток МНПК осуществляли по методу Хомчинского с использованием реактива TRI Reagent («Sigma») в соответствии с протоколом производителя. Реакцию обратной транскрипции ставили с помощью набора RevertAid First Stand cDNA Syntesis Kit («Thermo

Fisher Scientific»). После получения кДНК проводили ПЦР в режиме «реального времени» с использованием набора реактивов TaqMan Universal RT-PCR Master Mix, праймерами GATA3 (Hs00231122_m1), TBX21 (Hs00894392_m1), RORC (Hs01076112_m1) и FOXP3, определяющим полную молекулу FOXP3 (FOXP3_1 = Hs01092117_m1, FOXP3_2 = Hs00203958_m1) («Thermo Fisher Scientific»). ПЦР ставили в объеме 25 мкл по следующей программе: 1 цикл - 48°C 30 мин, 95°C 10 мин; 50 циклов - 95°C 15 сек, 60°C 1 мин, использовали прибор “7300 Real-Time PCR System” («Applied Biosystems»). Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 60°C. Для расчета относительных количеств исследуемых РНК использовали сравнительный метод. Уровень экспрессии мРНК исследуемых генов определяли относительно экспрессии мРНК β 2-микроглобулина по формуле: $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{генX} - Ct_{B2M})}$, где Ct – номер порогового цикла, B2M – ген β 2-микроглобулина, ген X – исследуемый ген.

Для определения экспрессии изоформ FOXP3 методом проточной цитофлуориметрии выделенные МНПК суспензировали в PBS с 1% BSA и 0,01% NaN₃, затем инкубировали с моноклональными антителами (МАТ) к поверхностным маркерам в том же буфере в течение 30 мин при +4°C, после чего отмывали и пермеабилizировали в течение 40 мин буфером «Foxp3 Fixation/Permeabilization Buffer» (eBioscience) согласно методическим указаниям фирмы. Клетки отмывали и инкубировали в течение 90 мин при +4°C в темноте с МАТ против FOXP3, снова отмывали и сразу (без фиксации) анализировали на проточном цитометре. Учитывая минорность фракции Treg, для уменьшения ошибки анализировали не менее 2×10^5 клеток, попадающих в гейт лимфоцитов. Лазерную цитометрию клеток осуществляли на проточном цитометре BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson) в стандартном режиме. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения FlowJo.

Использовали МАТ, меченные различными флуорохромами – FITC, PE, APC, PerCP-eFluor710 и PE-Cy7. Использовали следующие сочетания МАТ фирмы «eBioscience» (препараты для изотипических контролей той же фирмы): CD3-PE-Cy7, CD4-FITC, CD25-PerCP-eFluor710, FOXP3(PCN101)-APC, FOXP3(150D/E4)-PE. Особенностью данной методики является специфичность МАТ против молекулы FOXP3. МАТ клона PCN101 распознают эпитоп молекулы FOXP3, кодируемый экзоном 1, т.е. все изоформы молекулы; а МАТ клона 150D/E4 – эпитоп, кодируемый экзоном 2, т.е. только молекулы FOXP3-FL и FOXP3Δ7. При сочетании данных МАТ их одновременное связывание с клеткой указывает на наличие в клетке целой молекулы FOXP3, а при связывании только МАТ клона PCN101 – на экспрессию в клетке исключительно изоформ, лишённых экзона 2.

АСИТ проводили водно-солевыми экстрактами аллергенов из пыльцы деревьев 19 больным поллинозом ускоренным методом в условиях стационара. Клиническую эффективность АСИТ оценивали по анализу данных анкет пациентов с ВАШ, базируясь на величинах ВАШ в пределах от 0 до 100 мм.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов непараметрического анализа. Показатели представляли в виде $Me (L-H)$, где Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Часть показателей при распределении, близком к нормальному (визуальная оценка гистограммы распределения, $p > 0,05$ для критерия Шапиро-Уилка) представляли в виде $X \pm \sigma$, где X – среднее арифметическое значение, σ – среднеквадратическое отклонение. Для сопоставления двух независимых выборок по количественным признакам использовали U -критерий Манна-Уитни. Для анализа связи различий между связанными выборками применяли критерий Вилкоксона. Различие групп считали статистически значимым при $p < 0,05$. Обработку выполняли в программном пакете *StatSoft Statistica 12.0*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективность АСИТ причинно-значимыми аллергенами у больных поллинозом с сенсibilизацией к пыльце деревьев

Для проведения АСИТ случайным образом было отобрано 19 пациентов, которым был проведен 1 курс АСИТ классическим методом водно-солевыми экстрактами из смеси пыльцы деревьев («Микроген») подкожно по ускоренной схеме до суммарной дозы аллергена не менее 6000 PNU. Забор крови проводили трехкратно: 1) в период скрининга (до АСИТ); 2) после окончания курса АСИТ, но до сезона палинации (после АСИТ); 3) после курса АСИТ по окончании сезона палинации (после сезона палинации). Группами сравнения служили 19 пациентов с поллинозом, которым не проводилась АСИТ, а также группа здоровых добровольцев без атопии – 24 человека (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика групп пациентов

Пол	1 гр. (АСИТ), n=19	2 гр. (без АСИТ), n=19	Группа сравнения, n=24
Медиана возраста, лет	33 (28-46)	32,5 (26-46)	33 (24-50)
Мужчины n=39	10	13	16
Женщины n=23	9	6	8
Анамнез заболевания не менее 2-х лет	+	+	-
Наличие сопутствующей сенсibilизации к другим аэроаллергенам, n	4	3	-
Средняя оценка симптомов по ВАШ	64±13	61±11,5	0

При аллергологическом обследовании у всех больных выявлена сенсibilизация к аллергенам из пыльцы деревьев (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты аллергологического обследования перед проведением АСИТ

Диагноз Аллергены	До лечения		После лечения Через 3 недели	
	АР п=12	АР+БА п=7	АР п=12	АР+БА п=7
Пыльцевые аллергены. Из них:				
Пыльца деревьев	12	7	12	7
Пыльца злаковых	1	1	1	1
Пыльца сложноцветных	1	1	1	1
Бытовые аллергены:				
Дом пыль	1	1	1	1
Dermatoph. Farinae	0	0	0	0
Dermatoph. pteronissinus	0	0	0	0
Библиотечная пыль	1	1	1	1
Эпидермальные аллергены. Из них:				
Шерсть кошки	1	1	1	1
Шерсть собаки	1	1	1	1

Все больные хорошо переносили АСИТ, ни у одного из них не отмечалось побочных нежелательных явлений системного характера (головная боль, слабость, лихорадка и др.).

Суммарную эффективность АСИТ оценивали по принятым в России критериям (таблица 3).

Таблица 3 – Эффективность АСИТ

Число пациентов	АР, n=12	АР+БА, n=7
Отличный результат	4	2
Хороший результат	7	4
Удовлетворительный результат	1	1
Лечение без эффекта	0	0

Таблица 4 – Интенсивность симптомов у пациентов с поллинозом до и после АСИТ по сравнению с пациентами, не получавшими специфическую терапию, в баллах ВАШ

Симптомы	1 группа (АСИТ)		2 группа (симптоматическая терапия)	
	До АСИТ	После АСИТ	До терапии	На фоне симптоматической терапии
Заложенность носа	61±10	31±15*	62±6	46±10
Чихание	42±7	24±6*	43±4	35±5
Ринорея	56±14	25±8*	48±10	36±11
Зуд в полости носа	52±16	31±6*	54±9	41±7
Зуд век	41±8	15±4*	39±8	30±4
Слезотечение	38±16	22±8*	34±11	26±9
Покраснение глаз	31±12	20±6	30±9	18±4
Кашель	28±14	11±4	29±7	12±6
Першение в горле	36±5	12±2	32±8	13±4
Эпизоды затрудненного дыхания	32±7	21±4*	31±2	12±5
Эпизоды удушья	12±3	5±1	10±4	5±2
Другие симптомы	8±4	5±1	6±4	4±2

* – $p < 0,05$ относительно группы пациентов с сенсibilизацией к аллергенам из пыльцы деревьев, не получавших АСИТ

Хорошие и отличные результаты получены у 90% больных АР и сочетанием АР и БА уже после 1 курса АСИТ. Клиническая эффективность АСИТ оценивалась по общепринятым критериям, с использованием ВАШ, основанным на оценке интенсивности исходного и после АСИТ состояния больного по следующим симптомам (таблица 4): назальные (ринорея,

заложенность носа, зуд слизистой носа, чихание); неназальные (слезотечение, зуд в глазах, зуд в ушах, зуд верхнего неба); другие симптомы.

Экспрессия мРНК транскрипционных факторов *GATA3*, *TBX21*, *RORC* и *FOXP3* у больных поллинозом с сенсibilизацией к пыльце деревьев

На первом этапе исследования нами была проведена оценка клеточного состава периферической крови пациентов с поллинозом. У всех пациентов с АР как до проведения АСИТ, так и после, при сравнении с показателями группы здоровых доноров не было выявлено никаких отличий по количеству лейкоцитов, лимфоцитов и CD4⁺ Т-клеток в периферической крови (p>0,05, таблица 5).

Таблица 5 - Абсолютное количество клеточных популяций (x10⁹ клеток/л) в периферической крови пациентов с АР и группы сравнения

Группа	Лейкоциты	Лимфоциты	CD4 ⁺ Т-клетки
Группа сравнения	6,3 (5,5–7,6)	1,9 (1,7–2,7)	0,8 (0,6–1,0)
АР (все)	5,9 (5,4–7,3)	2,0 (1,6–2,5)	0,8 (0,6–1,1)
До АСИТ	6,3 (5,4–7,3)	2,1 (1,7–2,5)	0,9 (0,6–1,1)
После АСИТ	5,9 (5,6–6,8)	2,0 (1,8–2,5)	0,9 (0,7–1,1)
После сезона палинации	5,6 (5,4–7,9)	2,0 (1,6–2,3)	0,8 (0,6–1,0)

При исследовании уровня экспрессии мРНК транскрипционных факторов, определяющих Th1/Th2 поляризацию иммунного ответа (таблица 6), в группе пациентов с АР было выявлено снижение уровня экспрессии мРНК как *GATA3* (в 1,1 раза), так и *TBX21* (в 1,4 раза) и увеличение соотношения *GATA3/TBX21* в 1,5 раза относительно показателей здоровых людей. Уровень экспрессии мРНК *GATA3* у больных с АР составил 5,16 (3,74–8,11) при содержании 5,68 (3,95–8,37) у здоровых добровольцев, а *TBX21* - 0,99 (0,71–1,52) при уровне 1,39 (0,60–2,21) в контроле. Таким образом было выявлено снижение уровня экспрессии мРНК обоих

транскрипционных факторов, определяющих поляризацию иммунного ответа: как *GATA3*, так и *TBX21*, но с преимущественным уменьшением транскрипционного фактора, определяющего развитие Th1 - *TBX21*. Однако изменения содержания транскрипционных факторов у пациентов с АР не были статистически значимы по сравнению с показателями группы сравнения ($p=0,80$).

Таблица 6 - Уровень экспрессии мРНК *GATA3*, *TBX21*, *RORC* и *FOXP3* в МНПК пациентов с АР и здоровых добровольцев

Группа	GATA3	TBX21	RORC	FOXP3	GATA3/ TBX21
Группа сравнения	5,68 (3,95-8,37)	1,39 (0,60-2,21)	0,54 (0,32-1,09)	1,03 (0,68-1,57)	3,6 (3,0-6,6)
АР (все)	5,16 (3,74-8,11)	0,99 (0,71-1,52)	0,36 (0,28-0,65)	0,75 (0,51-1,27)	5,3 (3,7-9,2)
До АСИТ	5,13 (4,17-8,21)	0,79 (0,46-1,24)	0,43 (0,20-0,55)	1,21 (0,54-1,33)	7,7* (6,5-10,3)
После АСИТ	4,75 (3,60-8,86)	0,78 (0,50-1,13)	0,37 (0,22-0,56)	0,78 (0,51-1,46)	6,9 (4,8-12,1)
После палинации	5,06 (4,10-7,11)	0,91 (0,67-1,19)	0,25* (0,21-0,33)	0,90 (0,74-0,97)	6,7 (4,5-8,1)

* – $p<0,05$ относительно группы сравнения

В группе пациентов, отобранных для проведения АСИТ, данная тенденция сохранилась. Экспрессии мРНК *GATA3* у данных пациентов с АР составила 5,13 (4,17-8,21) при содержании 5,68 (3,95-8,37) у здоровых доноров, а *TBX21* - 0,79 (0,46-1,24) при уровне 1,39 (0,60-2,21) в контроле, а соотношение *GATA3/TBX21* уже в 2,1 раза превышало показатель здоровых людей, и отличие стало статистически значимым, что подтвердило наличие Th1/Th2-дисбаланса у пациентов с АР до проведения АСИТ ($p=0,004$). После проведения АСИТ соотношение *GATA3/TBX21* снизилось и перестало статистически значимо отличаться от показателя нормы ($p=0,79$), не достигая

последней, но отражая положительный эффект от проведенной терапии, который сохранялся до окончания сезона палинации. Также у пациентов с АР и проведенной АСИТ по окончании сезона палинации было отмечено снижение экспрессии мРНК транскрипционного фактора RORC, что так же можно расценивать в качестве положительного (противовоспалительного) эффекта от проведенной терапии. Уровень экспрессии мРНК RORC у больных с АР после сезона пыления деревьев составил 0,25 (0,21-0,33) при содержании 0,54 (0,32-1,09) у группы сравнения (P=0,02). Следовательно, изменение экспрессии мРНК RORC обнаруживается не сразу после проведения АСИТ, а имеет отложенный результат, проявляясь лишь к концу сезона палинации. Анализ уровня экспрессии мРНК, кодирующей полную молекулу FOXP3, не показал статистически значимых изменений по сравнению со здоровыми добровольцами ($p > 0,05$, таблица 6).

Экспрессия молекулы FOXP3 и ее изоформ в лимфоцитах периферической крови у больных поллинозом с сенсibilизацией к аллергенам из пыльцы деревьев

Treg определяли с помощью проточной цитофлуориметрии как CD3⁺CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-клетки. При исследовании их содержания у всех пациентов с АР было выявлено достоверное снижение в периферической крови в 1,5 раза доли Treg (CD25⁺FOXP3⁺) среди CD4⁺-Т-клеток по сравнению с их содержанием у здоровых доноров (таблица 7). Доля Treg среди CD4⁺-Т-клеток у больных с АР составила 2,3% (1,9–3,2) при содержании 3,5% (2,7–4,3) у группы сравнения ($p = 0,02$).

Также у всех пациентов с поллинозом было выявлено статистически значимое снижение в 1,3 раза абсолютного количества Treg в крови относительно показателей здоровых доноров: у больных с АР их содержание составило $19,8 \times 10^6$ клеток/л (13,9–27,3) при уровне 26,4 клеток/л (21,0–36,5) у здоровых доноров ($p = 0,03$, таблица 8).

Таблица 7 – Относительные показатели Treg периферической крови пациентов с аллергическим ринитом и здоровых людей из группы возрастного контроля (%)

Группа	Доля Treg среди CD4 ⁺ -Т-клеток
Доноры	3,5 (2,7–4,3)
АР (все)	2,3* (1,9–3,2)
До АСИТ	2,4* (1,8–3,1)
После АСИТ	2,5 (2,0–2,9)
После сезона палинции	2,6 (2,0-3,3)

* – $p < 0,05$ относительно группы здоровых доноров

Однако в группе, отобранной для проведения АСИТ, уменьшение абсолютных показателей перестало быть статистически значимым, возможно, вследствие двукратного сокращения объема выборки: $20,8 \times 10^6$ клеток/л (15,4–31,2) при содержании $26,4 \times 10^6$ клеток/л (21,0–36,5) у здоровых доноров ($p=0,10$, таблица 8).

Таблица 8 – Абсолютное количество Treg ($\times 10^6$ клеток/л) в периферической крови пациентов с АР и группы сравнения

Группа	Treg	FOXP3-FL Treg	FOXP3 Δ 2 Treg
Группа сравнения	26,4 (21,0–36,5)	9,3 (5,7–14,6)	17,4 (11,9–23,0)
АР (все)	19,8* (13,9–27,3)	7,7 (4,9–10,2)	11,7* (8,4–16,8)
До АСИТ	20,8 (15,4–31,2)	8,6 (6,5–11,8)	11,7* (9,5–17,6)
После АСИТ	23,1 (13,6–33,7)	10,6 (5,7–14,1)	10,2 (8,1–19,1)
После сезона палинции	22,2 (11,0-32,1)	6,2 (3,1-9,0)	10,8 (8,3-23,5)

* – $p < 0,05$ относительно группы сравнения

Снижение количества Treg у пациентов с аллергией в основном было обусловлено уменьшением численности Treg, экспрессирующих только изоформу FOXP3, лишенную продукта экзона 2 (FOXP3 Δ 2 Treg): у больных

АР их абсолютное количество составило $11,7 \times 10^6$ клеток/л (13,9–27,3) при $17,4 \times 10^6$ клеток/л (11,9–23,0) у здоровых доноров ($P=0,02$, таблица 8). Таким образом, данный показатель при аллергии был в 1,5 раза ниже, чем в группе здоровых доноров, и не изменился после сокращения объема выборки при формировании группы для проведения АСИТ, составив $11,7 \times 10^6$ клеток/л (9,5–17,6) (таблица 8). Таким образом, было показано, что для АР характерно снижение количества и доли Трег в периферической крови в основном за счет FOXP3Δ2 Трег.

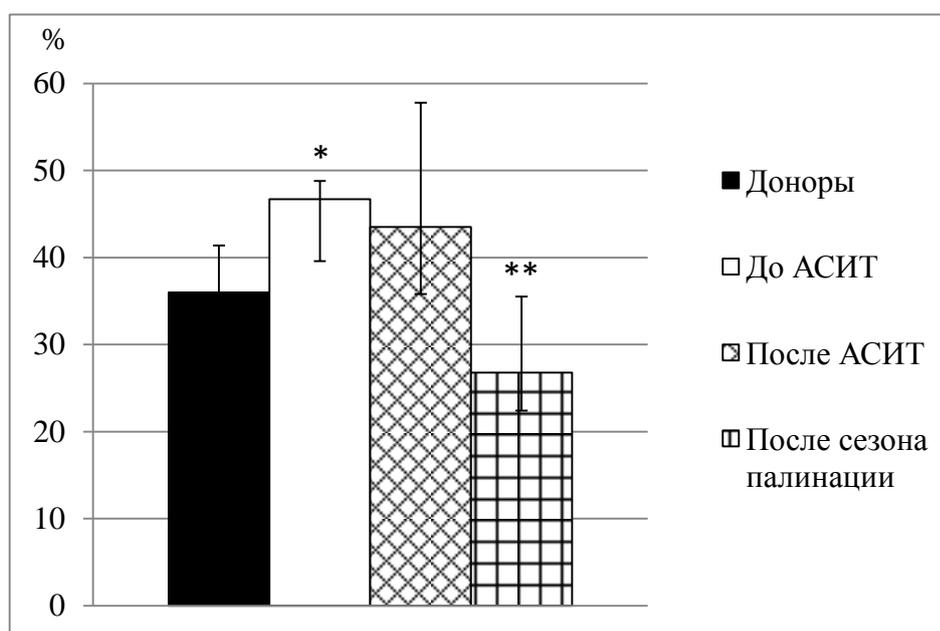


Рисунок 1 – Доля Трег, экспрессирующих FOXP3-FL, в периферической крови пациентов с поллинозом и группы сравнения

* – $p < 0,05$ относительно группы сравнения;

** – $p < 0,05$ относительно показателей до АСИТ

Наиболее ярким фактом стало уменьшение почти в 2 раза доли Трег, экспрессирующих полную молекулу FOXP3 (FOXP3-FL), у пациентов, прошедших АСИТ, по окончании сезона палинации (рисунок 1). Доля FOXP3-FL Трег в периферической крови пациентов с поллинозом до проведения специфического лечения составила 46,7% (39,6–49,8), после АСИТ - 43,5% (35,8–57,8), а после сезона пыления - 26,8% (22,4–35,5) ($P=0,01$ относительно показателей до проведения АСИТ).

Таким образом, нами показано, что для пациентов с АР характерно уменьшение доли и абсолютного количества Treg в основном за счет FOXP3 Δ 2 Treg в периферической крови, что, вероятно, обуславливает снижение их функциональной активности. При этом снижение доли FOXP3-FL Treg (или относительное накопление FOXP3 Δ 2 Treg) у пациентов с АР после проведения АСИТ, особенно выраженное по окончании сезона палинации, может свидетельствовать об относительном усилении функциональной активности Treg. Следовательно, противовоспалительный эффект после АСИТ носит длительный характер, сохраняющийся после сезона палинации. Данный способ диагностики может стать кандидатным прогностическим биомаркером для отбора пациентов с высокой перспективной эффективностью проводимой АСИТ при поллинозе.

ВЫВОДЫ

1. Предложен новый запатентованный способ оценки эффективности проведения аллерген-специфической иммунотерапии при аллергическом рините.
2. Впервые показано, что для пациентов с поллинозом характерно снижение в периферической крови функционально активных регуляторных Т-лимфоцитов за счет уменьшения изоформ с делецией экзона 2.
3. В группе пациентов с поллинозом выявлено снижение уровня экспрессии мРНК *GATA3* и *TBX21*, а также увеличение соотношения *GATA3/TBX21* относительно показателей группы сравнения, что подтвердило наличие Th2-дисбаланса у пациентов с поллинозом до проведения АСИТ.
4. После проведения АСИТ у пациентов с положительным клиническим эффектом констатировалось снижение соотношения *GATA3/TBX21* до показателей нормы, а также уменьшение доли Treg, экспрессирующих функционально неактивную полную молекулу FOXP3,

сохраняющееся на период после палинации, что подтверждает длительный противовоспалительный эффект АСИТ.

5. Впервые соотнесены показатели эффективности АСИТ с известной схемой регуляции иммунного ответа, а именно после АСИТ у пациентов с положительным клиническим эффектом констатируется снижение соотношения *GATA3/TBX21* и экспрессии мРНК транскрипционного фактора RORC, определяющего дифференцировку провоспалительных Th17-клеток, до показателей нормы, а также уменьшение доли Treg, экспрессирующих функционально неактивную полную молекулу FOXP3.

6. Доказано участие Treg в формировании специфической гипосенсибилизации, сохраняющейся продолжительное время: относительное накопление FOXP3 Δ 2 Treg, наиболее выраженное по окончании сезона палинации, свидетельствует об усилении функциональной активности Treg и может рассматриваться как прогностический критерий эффективности АСИТ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Курбачева, О.М. Бронхолитическая терапия при бронхиальной астме. Как правильно сделать выбор? [Текст] /О.М. Курбачева, С.А. Польшер, Д.С. Смирнов // Российский аллергологический журнал. - 2014. - №5. - С. 28-36.

2. Курбачева, О.М. Аллергический ринит. Вечная проблема и ее современное решение. [Текст] / О.М. Курбачева, С.А. Польшер, Д.С. Смирнов // Медицинский совет. Оториноларингология. - 2015. - №5. - С. 84-91.

3. Курбачева, О.М. Современный подход к лечению респираторной аллергии [Текст] / О.М. Курбачева, С.А. Польшер, Д.С. Смирнов // Consilium Medicum. Respiratory organs diseases. – 2016. – С. 28-35.

4. **Смирнов, Д.С.** Перспективы изучения экспрессии молекулы FOXP3 и ее изоформ при аллергических заболеваниях [Текст] / **Д.С. Смирнов, О.М. Курбачева, С.А. Польшер, К.С. Павлова** // Российский Аллергологический Журнал. – 2017. - №2. - С.22-30.

5. **Смирнов, Д.С.** Возможности азеластина в терапии хронического ринита [Текст] / **Д.С. Смирнов, О.М. Курбачева.** // Вестник оториноларингологии - 2017. - № 6. - С. 52-59.

6. Феденко, Е.С. Эффективность применения очистителей воздуха LG PURICARE™ в комплексной терапии больных сезонным и круглогодичным аллергическим риноконъюнктивитом и бронхиальной астмой [Текст] / Е.С. Феденко, О.Г. Елисютина, А.О. Литовкина, **Д.С. Смирнов, О.М. Курбачева** // Российский Аллергологический Журнал. – 2018. - №1-1. - С.16-41.

7. **Смирнов, Д.С.** Анализ экспрессии изоформ молекулы FOXP3 регуляторными Т-клетками периферической крови при аллергическом рините до и после проведения аллергенспецифической иммунотерапии [Текст] / **Смирнов Д.С., Донецкова А.Д., Литвина М.М., Никонова М.Ф., Митин А.Н., Курбачева О.М.** // Иммунология. 2018. – Т. 39, №5–6. - С. 282-286.

8. Пат. 2700788, Российская Федерация, МПК G01N 33/53 Способ оценки эффективности проведения аллерген-специфической иммунотерапии при аллергическом рините / **Донецкова А.Д., Смирнов Д.С., Курбачева О.М., Литвина М.М., Никонова М.Ф., Митин А.Н.**; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Государственный научный центр "Институт иммунологии" Федерального медико-биологического агентства России. – 2019101341, заявл. 17.01.19; опубл. 23.09.19, Бюл. № 27. – 14 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

A3 – аллергические заболевания

АР – аллергический ринит

АРК – аллергический риноконъюнктивит

АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия

БА – бронхиальная астма

ВАШ – визуальная аналоговая шкала

МАТ – моноклональные антитела

МНПК – мононуклеары периферической крови

IPЕХ-синдром – Х-сцепленная иммунная дисрегуляция,
полиэндокринопатия, энтеропатия

Th1 – Т-хелперы 1 типа

Th2 – Т-хелперы 2 типа

Treg – регуляторные Т-лимфоциты