

УДК 616.248-053.2-039.12-097:577.1

ІМУНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ФЕНОТИПУ АСТМИ ПІЗЬНОГО ПОЧАТКУ У ДІТЕЙ ЗА АЛЬТЕРНАТИВНОГО ХАРАКТЕРУ АЦЕТИЛЮВАННЯ

Л.О. Безруков, С.І. Тарнавська

ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет», м. Чернівці, Україна

Immunologic features of the late onset asthma phenotype in children under the alternative types of acetylation

Bezrukov L.A., Tarnavska S. I.

Higher state educational establishment of Ukraine «Bukovinian State Medical University», Chernovtsy city, Ukraine

The objective. To study the immunological particularities of the late onset asthma phenotype in children depending on the type of acetylation for the purpose of development of a differentiated approach to the treatment of this disease.

Patients and methods. A complex examination of 72 children with a late onset asthma phenotype has been performed. It has been studied some indices of cellular and humoral immunity, namely, the content of T-lymphocytes and their subpopulations in peripheral blood and, as well, serum levels of immunoglobulin's (A, M, G, E classes) and interleukins -4, -5, -8, and also such genetic marker as a type of acetylation.

Results. There has been determined an association of the slow acetylation type with activation of cytotoxic (CD8) T-lymphocytes (related risk – 3.1, odds ratio – 5.5), and, as well, with increase (in 1.2 times) of serum levels of both immunoglobulin M and interleukin - 8.

In children with a late onset asthma phenotype the fast acetylating type has been corresponded to a 1.4 times higher relative content of CD4-lymphocytes and 2.7 times higher relative content of lymphocytes CD22>20% in a peripheral blood, as well as to a 3.7 times more likely chance of registration of serum level of interleukin-5>3.7 pg/ml.

Conclusion. The studying of immunological particularities of the late onset asthma phenotype in children, taking into account individual genetic markers, such as the acetylating type, will let to specify the mechanisms of airway inflammation and, as well, to develop a differentiated approach to the treatment and preventive actions.

Key words: children, bronchial asthma, type of acetylation, immunological mechanisms.

Иммунологические особенности фенотипа астмы позднего начала у детей при альтернативном характере ацетилирования

Безруков Л.А., Тарнавская С.И.

ВГУЗ Украины «Буковинский государственный медицинский университет», г. Черновцы, Украина

Цель. Исследовать иммунологические особенности фенотипа астмы позднего начала у детей в зависимости от типа ацетилирования для разработки дифференцированного подхода к лечению данной патологии.

Материалы и методы. Проведено комплексное обследование 72 детей с фенотипом астмы позднего начала. Изучались показатели клеточного и гуморального иммунитета, содержание в периферической крови Т-лимфоцитов и их субпопуляций, а в сыворотке крови - уровень иммуноглобулинов классов А, М, G, E общий, интерлейкина-4, -5, -8, а также генетический маркер – характер ацетилирования.

Результаты. Установлена ассоциация медленного характера ацетилирования с активацией Т-цитотоксических CD8 лимфоцитов (относительный риск – 3,1, соотношение шансов – 5,5), а также с увеличением в 1,2 раза содержания иммуноглобулина М и интерлейкина - 8 в сыворотке периферической крови. Быстрый характер ацетилирования у детей с фенотипом астмы позднего начала ассоциировал с 1,4 раза более высоким относительным содержанием CD4-лимфоцитов, повышением шансов регистрации содержания лимфоцитов CD22>20% – в 2,7 раза и интерлейкина-5>3,7 пг/мл – в 3,7 раза в периферической крови.

Заключение. Изучение иммунологических особенностей фенотипа астмы позднего начала у детей с учетом индивидуальных генетических маркеров, например характера ацетилирования, позволит установить механизмы реализации воспаления дыхательных путей и разработать дифференцированный подход при выборе лечебно-профилактических мероприятий.

Ключевые слова: дети, бронхиальная астма, тип ацетилирования, иммунологические механизмы.

Адреса для кореспонденції:

Безруков Леонід Олексійович – д.мед.н., професор кафедри педіатрії та дитячих інфекційних хвороб ВДНЗУ «Буковинський державний медичний університет», 58000, м. Чернівці, вул. Руська, 207А, Обласна дитяча клінічна лікарня, кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб; тел. роб. (0372) 575-660, e-mail: leobezrukov@yandex.ru

Проблема бронхіальної астми в нашій країні не втрачає актуальності оскільки наразі залишаються невирішеними питання гіподіагностики даного захворювання у ранньому віці [1]. Водночас, несвоєчасна верифікація діагнозу астми у дітей може сприяти несприятливому перебігу з формуванням тяжких форм захворювання та ранній інвалідизації пацієнтів.

Відомо, що фенотипу БА пізнього початку (ФАПП) притаманні нормальний рівень імуноглобуліну Е у сироватці крові та негативні шкірні алергопроби [2], проте інші дослідження вказують, що у 76% пацієнтів із даним фенотипом (late-onset asthma) зафіксовано atopічну реакцію організму та схильність до алергії [3]. Деякі науковці встановили чутливість до інгаляційних алергенів у дітей за наявності в них як фенотипу раннього, так і пізнього початку бронхіальної астми [4]. Так Christina B. Miranda [5] виявила, що у дітей із late-onset asthma відмічався підвищений рівень еозинофільних гранулоцитів у периферичній крові при зменшеному вмісті CD3, Т-лімфоцитів, функція яких асоціює із хелперною/індукторною, та які є одним з маркерів atopічного запалення.

Особливо суперечливими, мабуть, слід визнати дані щодо характеру місцевої запальної відповіді дихальних шляхів (еозинофільна або нейтрофільна). За даними одних науковців нейтрофільна запальна реакція бронхів притаманна суто транзиторній БА у немовлят, а інші дослідження свідчать, що запальна відповідь дихальних шляхів має змішаний, еозинофільно-нейтрофільний характер як при БА раннього, так і пізнього початку [6].

Підкреслюється більш значуща патогенетична роль нейтрофільних гранулоцитів у розвитку запалення дихальних шляхів лише при фенотипі БА пізнього початку, у реалізації якого провідними тригерами виступають численні інфекційні чинники [7]. Натомість, у роботах інших дослідників наголошується на провідному значенні нейтрофільного запалення у формуванні клінічно-функціональних змін за тяжкої астми, яка найбільш часто трапляється за фенотипу БА пізнього початку [8].

Враховуючи досить суперечливі дані літератури, з питання імунологічних особливостей фенотипу астми пізнього початку, які дозволятимуть вчасно діагностувати дану патологію в ранньому віці, вважалось доцільним вивчити дані особливості перебігу ФАПП у дітей із урахуванням індивідуальних генетичних особливостей організму та, зокрема, ацетиляторного фенотипу.

Мета роботи. Ретроспективно дослідити імунологічні особливості фенотипу астми пізнього початку залежно від типу ацетилювання для встановлення механізмів реалізації запалення дихальних шляхів та розробки диференційованих підходів до лікування даної патології.

Матеріали і методи дослідження. Для досягнення поставленої мети проведено комплексне клінічно-імунологічне обстеження I-II рівнів 72 дітей, в яких визначався пізній початок БА. Вивчалися показники клітинно-

го та гуморального імунітету, вміст у периферичній крові Т-лімфоцитів та їх субпопуляцій, а у сироватці крові – концентрацію імуноглобулінів класів А, М, G, Е загальною, інтерлейкіну (ІЛ)-4, 5, 8.

Усім дітям визначали генетичний маркер – характер ацетилювання за методом В.М. Пребстинг – В.І. Гаврилова у модифікації Тимофєєвої, що характеризував особливості II фази системи біотрансформації ксенобіотиків.

Сформовано 2 клінічні групи: I група – 34 дитини з повільним характером ацетилювання (середній вік – $13,8 \pm 0,4$ роки, частка хлопчиків – 61,7%), II група – 38 пацієнтів зі швидкими темпами ацетилювання (середній вік – $12,7 \pm 0,4$ роки ($p > 0,05$); частка хлопчиків – 65,7% ($p > 0,05$)). За основними клінічними ознаками групи спостереження були зіставлюваними.

Одержані результати дослідження аналізували з позицій біостатистики та клінічної епідеміології за допомогою комп'ютерних пакетів "Statistica7" StatSoft Inc. та Excel XP для Windows, різницю показників вважали статистично значущою за $p < 0,05$. Відбір та обстеження пацієнтів відповідали принципам біомедичної етики в педіатрії.

Результати дослідження та їх обговорення. Припускаючи існування імунологічних особливостей фенотипу астми пізнього початку проведено, насамперед, порівняльний аналіз показників клітинної ланки імунітету у периферичній крові в дітей з урахуванням індивідуального ацетиляторного статусу. Результати досліджень показали, що у пацієнтів другої клінічної групи реєструвався у 1,4 рази вищий вміст у периферичній крові CD3-лімфоцитів та, зокрема, субпопуляції Т-лімфоцитів, функція яких асоціює із хелперною/індукторною (табл. 1).

Таблиця 1
Відносний вміст імунокомпетентних лімфоцитів та їх субпопуляцій (%), визначених методом CD-типування, у дітей із фенотипом астми пізнього початку залежно від типу ацетилювання

Клінічні групи	Показники			
	CD 3, %	CD 4, %	CD 8, %	CD 22, %
I група	21,8	15,1	20,2	18,9
II група	29,5	20,8	14,2	21,8
p	<0,05	>0,05	<0,05	>0,05

У результаті дослідження особливостей імунорегуляторного індексу (ІРІ) у пацієнтів груп спостереження, виявлено майже дворазове переважання даного показника у хворих зі швидким ацетиляторним фенотипом. Так, показники ІРІ у пацієнтів I та II груп дорівнювали: $0,7 \pm 0,01$ у.о. та $1,4 \pm 0,02$ у.о. ($p < 0,05$) відповідно. Таким чином, у хворих на ФАПП за повільного характеру ацетилювання імунологічні механізми захворювання пов'язані переважно з активацією субпопуляцій Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD8), які у 1,4 рази перевищували відповідні показники периферичної крові пацієнтів зі швидким ацетиляторним фенотипом. Показники ризику підвищеного відносного вмісту CD8-лімфоцитів у крові (>20%) у

дітей із ФАПП на тлі повільного ацетилювання дорівнювали: відносний ризик (ВР) – 3,1 [95%ДІ: 2,4-4,1] при співвідношенні шансів (СШ) – 5,5 [95%ДІ: 2,8-10,7].

Виходячи з наведеного вище, можна припустити, що у дітей із ФАПП за наявності повільного типу ацетилювання реалізація механізмів запалення не узгоджується з «Th2-гіпотезою» бронхіальної астми, а відбувається за участі Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD8+Т-клітин), що за даними окремих авторів прямо корелює та визначає виразну гіперсприйнятливості бронхів та тяжкість захворювання [9].

Водночас, у пацієнтів II клінічної групи відносний вміст CD22 лімфоцитів у периферичній крові виявився у 1,2 рази вищим, ніж у хворих із повільним характером ацетиляторних процесів. Отримані дані співпадають з повідомленнями щодо взаємозв'язків CD4 та CD22 лімфоцитів у дітей, хворих на БА [10]. Зокрема встановлено, що ризик підвищення відносного вмісту CD22 лімфоцитів у крові (>20%) у дітей із ФАПП за швидкого типу ацетилювання порівняно з хворими з повільним ацетиляторним статусом був статистично значимим та дорівнював: відносний ризик – 1,8 [95%ДІ: 1,3-2,3] при співвідношенні шансів – 2,7 [95%ДІ: 1,5-4,9].

Беручи до уваги виявлені особливості клітинної ланки імунної відповіді у дітей із урахуванням їх ацетиляторного статусу, нами проведений аналіз вмісту основних цитокінів та концентрації імуноглобулінів у сироватці крові у дітей із ФАПП залежно від швидкості ацетиляторних процесів (табл. 2).

Таблиця 2

Показники вмісту імуноглобулінів М, G, А, Е у сироватці крові дітей із фенотипом пізнього дебюту бронхіальної астми з врахуванням ацетиляторного статусу

Клінічні групи	Показники			
	IgM, мг/мл	IgG, мг/мл	IgA, мг/мл	IgE, МО/мл
I група	1,3±0,4	11,4±1,4	1,2±0,1	792,7±110,8
II група	1,1±0,2	11,6±1,2	1,4±0,2	752,7±103,1
p	<0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Виходячи з отриманих даних, очікуваного домінування IgE в крові пацієнтів із ФАПП на тлі швидкого ацетиляторного статусу (з урахуванням наявності вищого вмісту CD22 лімфоцитів у крові) не виявлено, що певною мірою не узгоджується з даними літератури [10]. Така особливість, можливо, пов'язана як із різними механізмами регуляції синтезу загального та специфічних IgE, так і з особливостями розвитку запальної відповіді обстежених пацієнтів.

Водночас виявлено, що у дітей I групи у 1,2 рази був вищим вміст у сироватці крові імуноглобуліну М. Оскільки даний імуноглобулін відображає один із механізмів первинної ланки імунної відповіді організму на патоген, його залучення, ймовірно, віддзеркалювало частішу тригерну роль інфекційних чинників у загостреннях хвороби у даної когорти хворих [11].

Подальший аналіз цитокинової ланки, а саме вмісту інтерлейкінів 4, 5, 8 у сироватці крові (табл. 3) пацієнтів груп порівняння, продемонстрував у п'ятеро вищий вміст ІЛ-5 у периферичній крові дітей зі швидким ацетиляторним статусом та у 1,2 рази вищі показники концентрації ІЛ-8 у хворих із повільним ацетиляторним статусом.

Таблиця 3

Показники вмісту інтерлейкінів 4, 5, 8 в сироватці крові дітей із фенотипом астми пізнього дебюту з врахуванням ацетиляторного статусу

Клінічні групи	Показники, пг/мл		
	Інтерлейкін 4	Інтерлейкін 5	Інтерлейкін 8
I група	11,3±1,4	3,7±0,9	9,6±1,4
II група	10,3±1,7	18,6±1,5	7,7±0,4
p	>0,05	<0,05	>0,05

Враховуючи те, що важливими індикаторами хронічного запалення при БА є протизапальні цитокіни ІЛ-4 та ІЛ-5, біологічний ефект яких пов'язаний із регуляцією синтезу імуноглобуліну Е та підтримкою еозинофільного запалення в респіраторному тракті [12], за результатами наших досліджень ймовірно є наявність залучення даного механізму запалення дихальних шляхів у хворих із ФАПП на тлі швидкого ацетиляторного статусу.

Дана гіпотеза підтверджується наявністю позитивних вірогідних кореляційних зв'язків вмісту у сироватці крові ІЛ-4 із показниками лабільності бронхів (r=0,5, p<0,05), гіперчутливості дихальних шляхів (r=0,5, p<0,05) та вмістом ІЛ-5 у сироватці крові (r=0,8, p<0,05) у дітей із ФАПП та швидким ацетиляторним статусом. Установлений міцний вірогідний кореляційний зв'язок вмісту у сироватці крові ІЛ-5 із показниками лабільності бронхів (r=0,7, p<0,05), підвищенням функціональної активності еозинофільних гранулоцитів крові за даними НСТ-тесту (r=-0,7; p<0,05), у дітей зі швидким ацетиляторним фенотипом порівняно до представників групи порівняння. Показники ризику підвищення вмісту ІЛ-5 у крові понад 3,7 пг/мл у дітей із ФАПП та швидким типом ацетилювання були вищими, ніж у повільних «ацетиляторів» та дорівнювали: ВР – 1,6 [95%ДІ: 1,1-2,3] при СШ – 3,7 [95%ДІ: 1,9-6,8].

Оскільки ІЛ-8 ініціює «респіраторний вибух» нейтрофільних гранулоцитів та викликає масивну інфільтрацію тканин нейтрофілами [13], що, у свою чергу, є потужним стимулом до збільшення гіперчутливості дихальних шляхів, можна припустити, що саме даний цитокін є основним пусковим патофізіологічним елементом реалізації ФАПП у дітей із повільним типом ацетилювання. Зазначене вище припущення щодо асоціації ІЛ-8 з ризиком реалізації гіперчутливості дихальних шляхів при наявності повільного типу ацетилювання підтверджувалося наявністю вірогідного кореляційного зв'язку вмісту ІЛ-8 у сироватці крові з показниками гіперчутливості бронхів (r=0,7, p<0,05) та

клінічними показниками контрольованості астми ($r=-0,7$, $p<0,05$) у дітей I групи. Таким чином, у представників даної групи відзначався у 1,2 рази вищий вміст ІЛ-8 у сироватці крові, який асоціював із розвитком гіперчутливості дихальних шляхів при відносному клінічному благополуччі, що потребує ретельного індивідуалізованого призначення протизапального лікування.

Узагальнюючи наведене вище, слід відзначити, що у дітей із ФАПП за наявності повільного ацетиляторного статусу реалізація механізмів запалення певною мірою не узгоджується з «Th2-гіпотезою» бронхіальної астми, а відбувається за участі Т-цитотоксичних лімфоцитів (CD8+Т-клітин) (відносний ризик – 3,1, співвідношенні шансів – 5,5), у 1,2 рази вищим вмістом імуноглобуліну М та інтерлейкіну 8, що корелюють з показниками контрольованості хвороби та гіперчутливості бронхів. Натомість у дітей зі швидким типом ацетилювання запалення дихальних шляхів ймовірно відбувалося за класичним «атопічним» варіантом за участі CD4+Т-лімфоцитів, CD22-лімфоцитів (відносний ризик -1,8, співвідношення шансів – 2,7), активації інтерлейкіну-5 (відносний ризик -1,6, співвідношення шансів – 3,7).

Висновки

1. У дітей із фенотипом астми пізнього початку за наявності швидкого типу ацетилювання запалення дихальних шляхів асоціювало з у 1,4 рази вищим відносним вмістом CD4+Т-лімфоцитів, CD22-лімфоцитів (відносний ризик -1,8, співвідношення шансів – 2,7), активацією інтерлейкіну-5 (відносний ризик -1,6, співвідношення шансів – 3,7).
2. У дітей із повільним типом ацетилювання фенотип астми пізнього початку асоціював із у 1,2 рази вищим вмістом імуноглобуліну М та інтерлейкіну – 8 у периферичній крові, що корелювали з показниками гіперчутливості бронхів ($r=0,7$, $p<0,05$) та клінічними показниками контрольованості астми ($r=-0,7$, $p<0,05$).
3. Показники ризику підвищення відносного вмісту Т-цитотоксичних-CD8-лімфоцитів у крові понад 20% у дітей із ФАПП та повільним характером ацетилювання були вищими та дорівнювали: відносний ризик – 3,1 [95%ДІ: 2,4-4,1] при співвідношенні шансів – 5,5 [95%ДІ: 2,8-10,7].

Література

1. Уманец Т.Р., Лапшин В.Ф. Сучасна концепція фенотипування бронхіальної астми. *Здоров'я України* 2014;1(28):52-54.
2. Green R.H., Pavord I. Stability of inflammatory phenotypes in asthma. *Thorax* 2012; 2: 46-57.
3. Hesselmar B., Enelund A.C., Eriksson B. The Heterogeneity of asthma phenotypes in children and

young adults. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012; 45:6-11.

4. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution to molecular approach. *Nat. Med.* 2012; 18(5):716-725.
5. Miranda C., Busacker A., Balzar S. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunology*. 2004; 113 (1): 101-108.
6. Koponen P., Helminen M., Paassilta M. Preschool asthma after bronchiolitis in infancy. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(1):76-80.
7. Baraldo S., Turato G., Bazzan N. Noneosinophilic asthma in children: relation with airway remodelling. *ERJ*. 2011; 38(3): 575-583.
8. Wang F., He X.Y., Baines K.J. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur. Respir. J.* 2011; 38: 567-574.
9. Kim Y.M., Kim Y.S., Jeon S.G. Immunopathogenesis of Allergic Asthma: More Than the Th2 Hypothesis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2013; 5:189-196.
10. Durrant M.D., Metzger D.W. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma". *Immunological Investigations*. 2010; 39(4-5): 526-549.
11. Колоскова О.К., Тарнавська С.І., Донська Т.В., Колісник І.Д. Клінічно-анамнестичні особливості фенотипу астми пізнього початку залежно від характеристики ацетиляторного статусу. *Буковинський медичний вісник*. 2015;19(3):69-72.
12. Persson C. Primary lysis of eosinophils in severe desquamative asthma. *Clin. Exper. Allergy*. 2014; 44(4): 173-183.
13. Monteseirin J. Neutrophils and Asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2009; 19(№5): 340-354.

References

1. Umanets T.R., Lapshin V.F. Sучасна kontseptsiya fenotipuvannya bronkhiialnoi astmi. *Zdorov'ya Ukraini* 2014;1(28):52-54.
2. Green R.H., Pavord I. Stability of inflammatory phenotypes in asthma. *Thorax* 2012; 2: 46-57.
3. Hesselmar B., Enelund A.C., Eriksson B. The Heterogeneity of asthma phenotypes in children and young adults. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012; 45:6-11.
4. Wenzel S.E. Asthma phenotypes: the evolution to molecular approach. *Nat. Med.* 2012; 18(5):716-725.
5. Miranda C., Busacker A., Balzar S. Distinguishing severe asthma phenotypes: role of age at onset and eosinophilic inflammation. *J Allergy Clin Immunology*. 2004; 113 (1): 101-108.
6. Koponen P., Helminen M., Paassilta M. Preschool asthma after bronchiolitis in infancy. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(1):76-80.

- ma after bronchiolitis in infancy. *Eur. Respir. J.* 2012; 39(1):76-80.
7. Baraldo S., Turato G., Bazzan N. Noneosinophilic asthma in children: relation with airway remodelling. *ERJ*. 2011; 38(3): 575-583.
 8. Wang F., He X.Y., Baines K.J. Different inflammatory phenotypes in adults and children with acute asthma. *Eur. Respir. J.* 2011; 38: 567-574.
 9. Kim Y.M., Kim Y.S., Jeon S.G. Immunopathogenesis of Allergic Asthma: More Than the Th2 Hypothesis. *Allergy Asthma Immunol. Res.* 2013; 5:189-196.
 10. Durrant M.D., Metzger D.W. Emerging roles of T helper subsets in the pathogenesis of asthma". *Immunological Investigations.* 2010; 39(4-5): 526-549.
 11. Koloskova O.K., Tarnavs'ka S.I., Dons'ka T.V., Kolisnik I.D. Klinichno-anamnestichni osoblivosti fenotipu astmi pizn'ogo pochatku zalezno vid kharakteristiki atsetil'yatornogo statusu. *Bukovins'kiy medichniy visnik.* 2015; 19(3):69-72.
 12. Persson C. Primary lysis of eosinophils in severe desquamative asthma. *Clin. Exper. Allergy.* 2014; 44(4): 173-183.
 13. Monteseirín J. Neutrophils and Asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 2009; 19(N°5): 340-354.

Відомості про авторів:

Безруков Леонід Олександрович – д.мед.н., професор кафедри педіатрії та дитячих інфекційних хвороб ВДНЗУ «Буковинський державний медичний університет», 58000, м. Чернівці, вул. Руська, 207А, Обласна дитяча клінічна лікарня, кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб; тел. роб. (0372) 575-660, e-mail: leobezrukov@yandex.ru

Тарнавська Світлана Іванівна – к.мед.н., доцент кафедри педіатрії та дитячих інфекційних хвороб ВДНЗУ «Буковинський державний медичний університет», 58000, м. Чернівці, вул. Руська, 207А, Обласна дитяча клінічна лікарня, кафедра педіатрії та дитячих інфекційних хвороб; тел. роб. (0372) 575-660, моб: +38(050) 564-34-41, e-mail: svitlanatarn@ukr.net

© Л.О. Безруков, С.І. Тарнавська, 2016