

**Е. А. Ружицкая, Т. А. Миненкова, Ю. Л. Мизерницкий, С. Э. Цыпленкова
Е. В. Сорокина, В. С. Сухоруков, Н. С. Лев, В. С. Котов**

Московский научно-исследовательский институт педиатрии
и детской хирургии
ул. Талдомская, 2, Москва, 125412, Россия

E-mail: asem43@mail.ru

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА И ЭОЗИНОФИЛИИ У ДЕТЕЙ С АЛЛЕРГИЧЕСКИМИ БРОНХОЛЕГОЧНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Представлены результаты оценки уровней цитокинов (IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2) у 87 детей в возрасте от 3 до 17 лет с аллергическими бронхолегочными заболеваниями (62 – с бронхиальной астмой, 17 – с гиперчувствительным пневмонитом, 8 – с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом) в зависимости от уровня эозинофилов и IgE в периферической крови. Выявлена прямая корреляционная зависимость концентрации IL-4 и IgE в сыворотке крови, а также IL-4 и относительного количества эозинофилов периферической крови. Показана ассоциация высокого уровня IL-4 с тяжелым течением бронхиальной астмы.

Ключевые слова: дети, аллергические бронхолегочные заболевания, эозинофилия, IgE, IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2.

Одним из наиболее частых клинико-лабораторных признаков аллергических заболеваний является эозинофилия. Современными исследованиями доказана потенциальная патогенетическая роль эозинофилов в развитии аллергической патологии [1–3]. В частности, показано, что эффекторная активность эозинофилов опосредует изменения в респираторном тракте у пациентов с аллергическими заболеваниями [4; 5]. Продемонстрировано участие эозинофилов в управлении эффектом Th2, ассоциированным с атопией, посредством продукции специфических хемокинов, цитокинов и энзимов [3; 4; 6]. Показана диагностическая значимость определения эозинофилов различной плотности при обследовании больных с эозинофилией [7–9].

Эозинофилы синтезируют и высвобождают широкий спектр медиаторов воспаления, включая катионные белки, цитокины, хемокины и факторы роста, активно участ-

вуя в межклеточных кооперативных взаимодействиях [7; 10], однако их влияние на различные звенья аллергического воспаления остается недостаточно изученным. Внимание, которое специалисты уделяют количественным изменениям и функции эозинофилов недостаточно по сравнению с их важной патогенетической ролью при аллергических заболеваниях. До настоящего времени мнение об эффекторной функции эозинофилов у здоровых лиц и при патологии остается неоднозначным [2; 11].

Аллергические болезни часто ассоциируются с эозинофилией, степень которой во многом влияет на характер поражения органов дыхания и клиническую картину. Индивидуальный анализ доступных маркеров аллергического воспаления мог бы способствовать более целенаправленной и успешной терапии. Перспективными в этом отношении представляются показатели цитокинового статуса. Описаны попытки применения ан-

тител к цитокинам в лечении пациентов с аллергическими бронхолегочными заболеваниями [4].

Цель исследования – определить уровни цитокинов (IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2) у детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями в зависимости от уровня эозинофилов и IgE.

Материал и методы

Проведено комплексное клинико-инструментальное и аллергологическое обследование 87 детей в возрасте от 3 до 17 лет, в том числе 62 – с бронхиальной астмой, 17 – с гиперчувствительным пневмонитом, 8 – с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом.

В зависимости от количества эозинофилов в периферической крови обследованные распределены на две группы: 1-я – 39 больных с относительным числом эозинофилов 5 % и более; 2-я – 48 пациентов с относительным числом эозинофилов менее 5 %.

Обследование включало рентгенографию (CD-PA Компакт диагност, «Philips», Германия) и компьютерную томографию («Aquilion», Франция) органов грудной клетки. Исследование функции внешнего дыхания проводили методом спирометрии (MasterScreen, «VIASYS Healthcare», Германия). Измерение уровня оксида азота в выдыхаемом воздухе осуществляли с помощью хемилюминесцентного газоанализатора 280i («Sievers», США). Аллергологическое обследование включало определение общего IgE методом ИФА, специфических IgE- и IgG-антител методом IMMUNOCUP. При необходимости проводили определение специфических преципитирующих антител методом встречного иммуноэлектрофореза.

Диагноз и тяжесть бронхиальной астмы устанавливали в соответствии с критериями, изложенными в Научно-практической программе «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (2008). Диагнозы остальных обследованных верифицированы согласно «Классификации основных клинических форм бронхолегочных заболеваний у детей» (2008).

У всех детей слепым способом определяли уровни цитокинов IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2 в сыворотке крови методом твердофазного «сэндвич»-энзим-связанного-иму-

носорбентного анализа. Использовали наборы UltraSensitive™ ELISA kits («BIO-SOURCE Introgen Corporation», США). Оценку результатов проводили с использованием программированного ридера «Anthos 2020» («Biochrom», Великобритания). Показатели цитокинового спектра сопоставляли с количественными показателями эозинофилов и уровнем IgE в периферической крови.

При математической обработке результатов использовали параметрические и непараметрические методы анализа из пакета компьютерных программ Statistica 6.0.

Результаты исследования и обсуждение

Количественные показатели эозинофилов и IgE у детей разных групп представлены в табл. 1. Показано, что абсолютное число эозинофилов в крови и концентрация IgE в сыворотке крови у детей 1-й и 2-й групп отличались достоверно ($p < 0,001$). При этом выявлена прямая корреляционная зависимость между числом эозинофилов и уровнем IgE ($r = 0,326$; $v = 85$; $p < 0,01$).

Средние концентрации цитокинов в сыворотке крови у детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями представлены в табл. 2. Концентрация IL-4 в сыворотке крови менее 4,0 пг/мл выявлена у 41 из 87 детей (47,1 %), в том числе у 5 больных с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом, 3 – с легкой бронхиальной астмой, 11 – с бронхиальной астмой средней степени тяжести, 14 – с тяжелой бронхиальной астмой и 8 детей с гиперчувствительным пневмонитом. Средние значения концентрации IL-4 в сыворотке крови (от 4,0 до 8,2 пг/мл) выявлены у 38 из 87 детей (43,7 %), в том числе у 3 больных с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом, 2 – с легкой бронхиальной астмой, 9 – с бронхиальной астмой средней степени тяжести, 16 – с тяжелой бронхиальной астмой и 8 детей с гиперчувствительным пневмонитом. Концентрация IL-4 в сыворотке крови свыше 9,0 пг/мл (от 9,4 до 170 пг/мл) установлена у 8 из 87 детей (9,2 %), у всех этих детей диагностирована тяжелая бронхиальная астма в периоде ремиссии.

Выявлена прямая корреляционная зависимость уровня IgE и IL-4 у обследованных ($r = 0,233$; $v = 85$; $p < 0,05$). При этом у детей

Таблица 1

Средние значения количества эозинофилов и концентрации IgE у детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями, $M \pm m$ (min ÷ max)

Показатель	Обследованные больные	
	1-я группа ($n = 39$)	2-я группа ($n = 48$)
Относительное количество эозинофилов в крови, %	$8,31 \pm 0,58$ (5÷17)	$2,03 \pm 0,13$ (0÷4)
Абсолютное количество эозинофилов в крови, $\times 10^9/\text{л}$	$0,673 \pm 0,042$ *** (0,431÷1,336)	$0,102 \pm 0,013$ *** (0÷0,392)
Концентрация IgE в сыворотке крови, МЕ/мл	$584,37 \pm 78,27$ *** (1÷1910)	$217,17 \pm 35,69$ *** (1÷1 260)

Примечание: *** – $p < 0,001$.

Таблица 2

Концентрация цитокинов в сыворотке крови детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями ($M \pm m$)

Цитокин	Показатель
IL-4, пг/мл	$11,267 \pm 4,381$
IL-5, пг/мл	$70,168 \pm 7,016$
TGF- β 1, нг/мл	$13,735 \pm 2,160$
TGF- β 2, нг/мл	$2,396 \pm 0,043$

с повышенным уровнем IgE (более 100 МЕ/мл) степень корреляционной зависимости возрастала ($r = 0,424$; $v = 34$; $p < 0,01$). Полученные данные свидетельствуют о тесной взаимосвязи содержания в сыворотке крови IgE и IL-4, одной из важнейших функций которого является индукция синтеза реактивов. У пациентов выявлена также прямая корреляционная зависимость относительного количества эозинофилов периферической крови и IL-4 ($r = 0,476$; $v = 85$; $p < 0,001$).

Таким образом, исследование концентрации IL-4, имеющего важное диагностическое значение при оценке особенностей аллергического воспаления, позволило выявить ее взаимосвязь с содержанием IgE в сыворотке крови, что подтверждает патогенетическую роль этого цитокина при аллергических заболеваниях легких у детей. Одновременно прослеживается четкая взаимосвязь высокого уровня IL-4 с тяжелым течением бронхиальной астмы.

Концентрация IL-5 в сыворотке крови составляла менее 50,0 пг/мл у 36 из 87 об-

следованных (41,4 %), в том числе у 7 больных с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом, 7 – с бронхиальной астмой средней степени тяжести, 15 – с тяжелой бронхиальной астмой и 7 детей с гиперчувствительным пневмонитом. Концентрация от 50 до 100 пг/мл зарегистрирована у 38 из 87 детей (43,7 %), в том числе у одного ребенка с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом, у 20 – с бронхиальной астмой средней степени тяжести и 17 больных – с тяжелой формой бронхиальной астмы. Высокое содержание IL-5 в сыворотке крови, превышавшее 100 пг/мл (от 109,8 до 523,8 пг/мл), выявлено у 13 лиц (14,9 %), в том числе у 5 больных со среднетяжелой и 3 – с тяжелой бронхиальной астмой, а также у 5 детей с гиперчувствительным пневмонитом. Таким образом, корреляционных взаимосвязей концентрации IL-5 с уровнем IgE и относительным количеством эозинофилов, связи его уровня с клинической формой аллергического заболевания не установлено.

Низкая концентрация TGF- β 1 (менее 1,2 нг/мл) зарегистрирована у 33 из 83 больных (39,8 %), в том числе у одного ребенка с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом, у 3 – с легкой бронхиальной астмой, 6 – с бронхиальной астмой средней степени тяжести, 13 – с тяжелой бронхиальной астмой и 10 детей с гиперчувствительным пневмонитом. Уровень этого цитокина от 1,2 до 9,8 нг/мл выявлен у 22 из 83 детей (26,5 %), в том числе у 2 больных с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом, 6 – с бронхиальной астмой средней степени тя-

жести, 9 – с тяжелой бронхиальной астмой и 5 детей с гиперчувствительным пневмонитом. Содержание TGF- β 1 в сыворотке крови превышало 10 нг/мл и составляло от 10,4 до 91,2 нг/мл у 28 из 83 больных (33,7%), в том числе у 12 детей со среднетяжелой (от 10,8 до 62,4 нг/мл), у 11 – с тяжелой бронхиальной астмой (от 10,4 до 57,6 нг/мл), у 3 – с аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (от 24,9 до 57,6 нг/мл) и у 2 детей с гиперчувствительным пневмонитом (от 13,2 до 55,2 нг/мл). Достоверной корреляционной зависимости концентрации TGF- β 1 с уровнем IgE и относительным количеством эозинофилов не выявлено.

Концентрация TGF- β 2 в сыворотке крови у 75 из 84 обследованных (89,3%) составляла от 2,0 до 2,9 нг/мл, у 6 (7,1%) – менее 2,0 и у 3 детей – более 3,0 нг/мл (от 3,12 до 4,94 нг/мл). Соотношение детей с различной степенью тяжести бронхиальной астмы, гиперчувствительным пневмонитом и аллергическим бронхолегочным аспергиллезом было сопоставимым в каждом диапазоне концентраций. Корреляционных взаимосвязей концентрации TGF- β 2 с уровнем IgE и относительным количеством эозинофилов также не определено.

Концентрации цитокинов в сыворотке крови больных с различным содержанием эозинофилов в периферической крови представлены в табл. 3. Показана достоверно более высокая концентрация IL-4 в сыворотке крови у больных с эозинофилией, чем у больных с нормальным или низким количеством эозинофилов в периферической крови ($p < 0,05$). Достоверных отличий других показателей не установлено.

Итак, анализ результатов обследования 87 детей, страдающих аллергическими бронхолегочными заболеваниями, позволил установить ряд закономерностей, касающихся ассоциированных с аллергической патологией показателей: количества эозинофилов периферической крови, концентрации IgE и цитокинов IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2 в сыворотке крови.

Показано, что концентрация IgE в сыворотке крови у больных с относительной и абсолютной эозинофилией достоверно выше, чем у детей с низким содержанием эозинофилов. Получена прямая корреляционная зависимость количества эозинофилов и концентрации IgE, а также прямая корреляционная зависимость концентраций IgE и IL-4 в сыворотке крови, что в целом соответствует данным литературы [7]. При этом у детей с повышением уровня IgE степень корреляционной зависимости возрастала. Кроме того, установлена прямая корреляционная зависимость относительного количества эозинофилов периферической крови и IL-4 у обследованных детей, что не противоречит данным литературы [12]. Результаты исследования не только свидетельствуют о тесной взаимосвязи содержания в сыворотке крови IgE и IL-4, но и подтверждают важную роль этого цитокина в патогенезе аллергических заболеваний [10].

При анализе концентрации исследованных цитокинов у обследованных детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями показано, что низкие (менее 4,0 пг/мл) и средние (от 4,0 до 8,2 пг/мл) уровни IL-4 в сыворотке крови не ассоциируются с каким-либо из исследованных ал-

Таблица 3
Средние концентрации цитокинов в сыворотке крови обследованных детей с аллергическими бронхолегочными заболеваниями ($M \pm m$)

Цитокин	Обследованные больные	
	1-я группа ($n = 39$)	2-я группа ($n = 48$)
IL-4, пг/мл	21,21 \pm 7,78 *	5,76 \pm 0,81 *
IL-5, пг/мл	74,26 \pm 9,20	67,90 \pm 9,68
TGF- β 1, нг/мл	16,75 \pm 3,34	11,97 \pm 2,81
TGF- β 2, нг/мл	2,37 \pm 0,05	2,41 \pm 0,06

Примечание: * – $p < 0,05$.

лергических заболеваний. Наоборот, содержание IL-4 в сыворотке крови, превышающее 9,0 пг/мл (в нашем исследовании от 9,4 до 170 пг/мл), было характерно для детей с тяжелым течением бронхиальной астмы (в периоде ремиссии). Таким образом, исследование концентрации IL-4 имеет диагностическое значение при оценке аллергического воспаления, обнаруживает взаимосвязь с содержанием IgE в сыворотке крови, а высокие уровни IL-4 ассоциируются с тяжелым течением бронхиальной астмы.

Четкой связи уровней IL-5, TGF- β 1 и TGF- β 2 с клиническим вариантом аллергической бронхолегочной патологии, в отличие от IL-4, в нашем исследовании не выявлено, как и корреляционных взаимосвязей концентрации этих цитокинов с уровнем IgE.

При сопоставлении концентрации цитокинов в сыворотке крови у больных с количеством эозинофилов в периферической крови показан достоверно более высокий уровень IL-4 в сыворотке крови у больных с эозинофилией, чем у больных с нормальным или низким количеством эозинофилов в периферической крови. Наличие такой закономерности подтверждается исследованиями, демонстрирующими участие IL-4 в процессе активации и дегрануляции эозинофилов [13; 14]. Полученные данные согласуются с фактами активного участия в межклеточных кооперативных взаимодействиях при аллергических заболеваниях как эозинофилов, так и IL-4, рецепторы к которому выявлены на лимфоцитах, макрофагах, тучных клетках, клетках различных гемопоэтических линий и фибробластах [10–14]. Достоверных отличий концентраций IL-5, TGF- β 1 и TGF- β 2 в зависимости от количественных показателей эозинофилов не выявлено.

Выводы

1. Результаты исследования убедительно демонстрируют взаимосвязь таких характерных для аллергических заболеваний показателей, как количество эозинофилов периферической крови, концентрация IgE и IL-4 в сыворотке крови.

2. Выявлена ассоциация тяжелого течения бронхиальной астмы с высокой концентрацией IL-4 в сыворотке крови больных.

3. Доказано, что количественные показатели эозинофилов коррелируют как с концентрацией IgE, так и с уровнем IL-4, участвующим в синтезе реактивов и процессе дегрануляции эозинофилов.

Список литературы

1. Adamko D., Lacy P., Moqbel R. Eosinophil Function in Allergic Inflammation: From Bone Marrow to Tissue Response // *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004. Vol. 4. P. 149–158.
2. Mahmudi-Azer S., Odemuyiwa S. O., Moqbel R. Intelligent Granules: Are Eosinophil Crystalloid Granules Inimitable? // *J. Clin. Immunol.* 2010. Vol. 126. P. 28–30.
3. Nair P., Pizzichini M. M., Kjarsgaard M., Inman M. D., Efthimiadis A., Pizzichini E., Hargreave F. E., O'Byrne P. M. Mepolizumab for Prednisone-dependent Asthma with Sputum Eosinophilia // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 360. P. 985–993.
4. Flood-Page P., Menzies-Gow A., Phipps S., Yung S., Wangoo A., Ludwig M. S., Barnes N., Robinson D., Kay A. B. Anti-IL-5 Treatment Reduces Deposition of ECM Proteins in the Bronchial Subepithelial Basement Membrane of Mild Atopic Asthma // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 112. P. 1029–1036.
5. Tulic M. K., Sly P. D., Andreus D., Crook M., Davoin F., Odemuyiwa S. O., Charles A., Hodder M. L., Prescott S. L., Holt P. G., Moqbel R. Thymic Indoleamine 2,3-dioxygenase-positive Eosinophils in Young Children: Potential Role in Maturation of Naive Immune System // *Am. J. Pathol.* 2009. Vol. 175. P. 2043–2052.
6. Haldar P., Brightling C. E., Gupta S., Montiero W., Sousa A., Marshall R. P., Bradling P., Green R. H., Wardlaw A. J., Pavord I. D. Mepolizumab and Exacerbations of Refractory Eosinophilic Asthma // *N. Engl. J. Med.* 2009. Vol. 360. P. 973–984.
7. Джальчинова В. Б., Чистяков Г. М. Эозинофилы и их роль в патогенезе аллергических заболеваний // *Рос. вестн. перинатологии и педиатрии.* 1999. № 5. С. 42–45.
8. Литвинова Л. С., Рязанцева Н. В., Новицкий В. В., Григорьева Е. С. Апоптоз эозинофильных гранулоцитов, опосредованный цитокинами, при больших эозинофилиях крови // *Цитология.* 2008. Т. 50, № 1. С. 67–71.
9. Новицкий В. В., Рязанцева Н. В., Литвинова Л. С., Колобовникова Ю. В., Григорьева Е. С., Суворова Е. В. Механизмы нару-

шения кооперации эозинофилов и иммунных клеток при формировании больших эозинофилий крови // Бюлл. сибир. мед. 2006. № 2. С. 52–61.

10. Paul W. E., Seder R. A. Lymphocyte Responses and Cytokines // Cell. 1994. Vol. 76. P. 241–251.

11. Moqbel R., Lacy P. New Concepts in Effector Functions of Eosinophil Cytokines // Clin. Exp. Allergy. 2000. Vol. 30. P. 1667–1671.

12. Melo R. C. N., Weller P. F., Dvorak A. M. Activated Human Eosinophils // Images Allergy Immunol. 2005. Vol. 138. P. 347–349.

13. Neves J. S., Perez S. A., Spencer L. A., Melo R. S., Reynolds L., Ghiran I., Mahmudi-

Azer S., Odemuyiwa S. O., Dvorak A. M., Moqbel R., Weller P. F. Eosinophil Granules Function Extracellularly as Receptor-mediated Secretory Organelles // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Vol. 105. P. 18478–18483.

14. Neves J. S., Radke A. L., Weller P. F. Cysteinyl Leukotrienes Acting Via Granule Membrane-expressed Receptors Elicit Secretion from Within Cell-free Human Eosinophil Granules // J. Allergy Clin. Immunol. 2010. Vol. 125. P. 477–482.

Материал поступил в редколлегию 07.06.2012

**E. A. Ruzhitskaya, T. A. Minenkova, Yu. L. Mizernitskij, S. E. Tsyplenkova
E. V. Sorokina, V. S. Sukhorukov, N. S. Lev, V. S. Kotov**

CORRELATION OF CYTOKINE STATUS AND EOSINOPHILIA IN CHILDREN WITH ALLERGIC BRONCHOPULMONARY DISEASES

Devoted to the results of estimation of cytokine levels (IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2) in 87 children at the age (3–17 years old) with allergic bronchopulmonary diseases (62 – with bronchial asthma, 17 – with hypersensitive pneumonitis, 8 – with allergic bronchopulmonary aspergillosis) in association with the number of eosinophils and IgE concentration of the peripheral blood. The right correlations: of IL-4 and IgE concentrations; IL-4 and eosinophil relative number in the peripheral blood was identified. The association between a high concentration of IL-4 and severe duration of bronchial asthma was also estimated.

Keywords: children, allergic bronchopulmonary diseases, eosinophilia, IgE, IL-4, IL-5, TGF- β 1, TGF- β 2.