Н.И.Кубышева¹, А.В.Максимова¹, Л.Б.Постникова², Е.В.Ермолаева¹, Л.Г.Лазарева¹,
В.В.Новиков³, С.К.Соодаева⁴

Участие растворимых антигенов адгезии и молекул гистосовместимости в развитии бронхиальной астмы у детей

1 — Детская клиническая больница № 27 "Айболит", г. Нижний Новгород;

2 — Военно-медицинский институт ФСБ РФ, г. Нижний Новгород;

3 — Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород;

4 — ФГУ НИИ пульмонологии Росздрава, г. Москва

N.I.Kubisheva, A.V.Maksimova, L.B.Postnikova, E.V.Ermolaeva, L.G.Lazareva, V.V.Novikov, S.K.Soodaeva

Role of soluble adhesion antigens and histocompatibility molecules in development of childhood bronchial asthma

Summary

We determined serum levels of soluble adhesion antigens CD50, CD54, soluble HLA class I molecules, HLA-DR, and relative number of antigen-positive blood mononuclears in asthmatic children. Increased concentrations of soluble CD54 and CD54 antigens and reduction in relative number of CD50+ and CD54+ mononuclear cells were revealed. In children with asthma, the level of serum soluble HLA-DR antigens and relative number of peripheral blood mononuclears were elevated. The worsening of asthma course was accompanied by the increase in CD50, CD54, HLA-DR serum levels. The inverse correlation between the serum levels of soluble CD54 and HLA-DR antigens and FEF₅₀ was revealed.

Резюме

У детей с бронхиальной астмой (БА) определяли сывороточный уровень растворимых антигенов адгезии CD50, CD54, растворимых молекул HLA I класса и HLA-DR и относительное количество мононуклеарных клеток периферической крови, положительных по этим же антигенам. Отмечено увеличение сывороточного содержания растворимых CD50- и CD54-антигенов на фоне снижения относительного содержания CD50+ и CD54+ мононуклеарных клеток. У детей с БА обнаружено повышение сывороточного уровня растворимых антигенов HLA-DR и HLA-DR+ мононуклеарных клеток периферической крови. Утяжеление БА сопровождалось увеличением сывороточного уровня растворимых CD50-, CD54-антигенов и молекул HLA-DR. Выявлена отрицательная корреляционная связь между сывороточной концентрацией растворимых антигенов CD54 и HLA-DR и величиной коэффициента МОС₅₀, отражающего проходимость средних бронхов, а также относительным содержанием HLA-DR+ мононуклеарных клеток крови и величиной коэффициента МОС₇₅, отражающего степень проходимости крупных бронхов.

Ключевую роль в аллергическом воспалительном процессе при бронхиальной астме (БА) играют изменения функциональной деятельности иммунной системы, одним из проявлений которых является накопление активированных Т-лимфоцитов, эозинофилов и тучных клеток в слизистой оболочке бронхов. Результатом реализации начальных иммунных этапов атопического воспаления с участием молекул гистосовместимости является рекрутирование воспалительных клеток посредством взаимодействия антигенов адгезии. К ним относятся молекулы ICAM-1, ICAM-3, LFA-1, Е-селектин, VCAM-1 и др. Повышение их мембранной экспрессии при воспалении инициирует миграцию клеток из кровеносного русла в шоковый орган для реализации эффекторных и регуляторных функций [1]. Исследования последних лет продемонстрировали, что антигены адгезии и молекулы главного комплекса гистосовместимости обнаруживаются как в мембрано-связанной форме на поверхности клеток, так и в растворимом виде в различных биологических жидкостях [2].

Растворимые формы (s-формы) дифференцировочных антигенов образуются за счет либо протео-

литического расщепления мембранных форм — шеддинга, кливеджа (от англ. *shed* — терять, *cleave* — срезать), либо альтернативного сплайсинга мРНК, приводящего к образованию транскрипта, соответствующего растворимой форме.

Растворимые формы мембранных белков клеток иммунной системы осуществляют чаще всего многофункциональное воздействие в организме человека. Это может быть блокада межклеточных мембранных взаимодействий и ограничение иммунного ответа либо трансигнализация, приводящая, в том числе, и к активации клетки.

В исследованиях различных лабораторий доказана несомненная прогностическая, мониторинговая и диагностическая значимость некоторых дифференцировочных антигенов, что может успешно использоваться при лечении и профилактике различного рода заболеваний [2, 3]. Однако сведения, касающиеся участия растворимых дифференцировочных антигенов в патогенезе БА, немногочисленны и противоречивы. Цель настоящей работы — определение сывороточного уровня растворимых форм антигенов адгезии CD50 (ICAM-3), CD54

(ICAM-1), молекул гистосовместимости I и II классов и относительного количества моноклеарных клеток периферической крови, положительных по этим же антигенам у больных БА разной тяжести течения.

Материалы и методы

Были обследованы 117 детей с БА в возрасте 7–14 лет, наблюдавшихся в аллергологическом центре детской городской клинической больницы № 27 "Айболит" г. Нижнего Новгорода. Иммунологические исследования проводились в периоде обострения заболевания. Контрольную группу составили 16 здоровых детей соответствующего возраста.

Диагноз БА был установлен согласно существующим стандартам, предусмотренным "Глобальной стратегией лечения и профилактики бронхиальной астмы" (пересмотр 2002 г.) [1] на основании данных анамнеза, клинической симптоматики, результатов аллергологического тестирования, иммунологического обследования и динамической оценки функции внешнего дыхания (ФВД).

По степени тяжести среди исследуемых детей выделено 3 группы. В 1-ю группу ($n = 17$) вошли дети с БА легкого персистирующего течения, во 2-ю ($n = 64$) — больные БА среднетяжелого течения, в 3-ю ($n = 36$) — дети с БА тяжелой степени. Среди них у 12 пациентов имелось сочетание БА и атопического дерматита, у 72 — БА и аллергического ринита.

При оценке аллергологического статуса методом *prick*-теста у 52 пациентов была выявлена сенсibilизация бытовыми аллергенами, 12 — пыльцевая аллергия, у 53 — поливалентная сенсibilизация бытовыми, пищевыми или пыльцевыми аллергенами.

Комплексное обследование включало: клиническое динамическое наблюдение; изучение клинических анализов крови, мокроты, цитологии носового секрета; рентгенологическое исследование органов грудной клетки и придаточных пазух носа (по клиническим показаниям); оценку параметров ФВД посредством компьютерной спирометрии; аллергологическое тестирование (*prick*-тест). По его результатам всем детям назначалась терапия, направленная на купирование бронхообструкции с учетом ее степени тяжести: небулайзерные ингаляции растворов ипратропия бромид / фенотерола, амброксола гидрохлорида в возрастных дозах, небулайзерные ингаляции будесонида.

Оценку параметров ФВД проводили методом компьютерной спирометрии на приборе "Виталог-граф-альфа" (Англия). Сывороточное содержание растворимых антигенов ICAM-1 (sCD54), ICAM-3 (sCD50), растворимых молекул HLA I класса (sHLA-I) и HLA-DR (sHLA-DR) определяли иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител серии ИКО и поликлональных антител, направленных против антигенов моноклеарных клеток периферической крови человека. Иммунофе-

нотипирование моноклеарных клеток периферической крови проводили методом непрямой иммунофлуоресценции посредством моноклональных антител. Относительное содержание антиген-положительных клеток учитывали с помощью люминесцентного микроскопа *Leitz*.

Статистическую обработку результатов выполняли с применением критериев Крускала–Уоллиса и Данна, коэффициента ранговой корреляции Спирмена, используя компьютерную программу *Biostat*.

Результаты и обсуждение

По результатам исследования нами было установлено, что нарастание степени тяжести БА у детей ассоциировано с увеличением сывороточной концентрации sCD50- и sCD54-антигенов адгезии и со снижением относительного количества CD50- и CD54-положительных клеток периферической крови. Эти значения достоверно отличались от аналогичных параметров здоровых детей ($p < 0,05$).

Известно, что молекулы адгезии обеспечивают контакт между клетками, поддерживают целостность тканей, миграцию лейкоцитов, взаимодействие клеток в процессе иммунных реакций. В инициации иммунного ответа и в формировании иммунологического синапса между лимфоцитами и антиген-презентирующими клетками важная роль отводится антигену CD50 (ICAM-3). В растворимой форме CD50 антиген, связываясь с такими лигандами, как LFA-1 и DC-SIGN, на поверхности антиген-презентирующих клеток, может тормозить процессы запуска иммунного ответа. При этом после первичного контакта LFA-1 с молекулой ICAM-3 вследствие более высокой аффинности начинает доминировать связывание LFA-1 с антигеном ICAM-1. В свою очередь, растворимые молекулы ICAM-1 способны модулировать адгезию лейкоцитов на эндотелии сосудов и межклеточные взаимодействия [4].

Уменьшение относительного содержания моноклеарных клеток CD50+ и CD54+ в периферической крови у обследованных нами больных с БА, вероятно, связано с миграцией этих клеток в шоковый орган для участия в воспалительном процессе. В свою очередь, обнаруженные высокие сывороточные концентрации растворимых антигенов ICAM-1 и ICAM-3 могут быть результатом рестриктивного механизма, направленного на торможение избыточной миграции воспалительных клеток в шоковый орган и купирование таким образом воспалительного процесса. С другой стороны, увеличение сывороточного содержания растворимых молекул адгезии может являться неблагоприятным фактором с точки зрения разрешения воспаления, поскольку блокируется возможность клеток-эффекторов реализовать свои функции во флогогенном очаге. Следствием этого может быть нарушение реализации воспалительного процесса, которое приводит к хронизации и утяжелению течения заболевания.

Если предположить, что антигены sCD54 и sCD50 в условиях аллергического воспаления при астме являются свидетелями активации клеток и действуют провоспалительно, то возрастание их сывороточного уровня при утяжелении БА может отражать тяжесть течения воспалительного процесса. Кроме того, известно, что торможение взаимодействия ICAM-1 с антигеном LFA-1 приводит к преимущественной дифференцировке Т-лимфоцитов в направлении Т-хелперов 2-го типа, характерного для атопии [5]. Можно допустить, что повышенные концентрации сывороточных антигенов CD50 и CD54 также способны вызвать смещение равновесия субпопуляций Т-лимфоцитов в сторону Т-хелперов 2-го типа.

В настоящее время известно, что система HLA обеспечивает реализацию и регуляцию иммунного ответа за счет не только мембранных белков гистосовместимости, но и их растворимых форм, способных вызывать апоптоз или анергию Т-лимфоцитов и натуральных киллеров [6, 7]. Исследование характера изменения концентрации sHLA-I и относительного содержания HLA-I+-моноклеарных клеток крови не выявило их достоверных изменений при БА у детей. Вероятно, это связано с тем, что молекулы HLA I класса не играют значимой роли в реализации аллергического воспаления при БА. Вследствие этого содержание молекул HLA I класса в крови больных БА не отражает состояние реактивности иммунной системы при астме.

Как видно из таблицы, существенные различия в сывороточном уровне sHLA-DR антигенов и HLA-DR+ моноклеарных клеток крови были обнаружены нами между детьми, больными астмой, и здоровыми ($p < 0,05$).

Мембранные молекулы HLA-DR принимают непосредственное участие в презентации антигенов, в том числе и аллергенов Т-хелперам. Увеличение относительного количества моноклеарных клеток HLA-DR+ при атопии ассоциируется с активацией моноцитов, В-лимфоцитов, а также Т-лимфоцитов (CD4+-, CD8+-клеток), экспрессирующих этот рецептор [8, 9].

Известно, что атопическое воспаление опосредуется гиперреактивным ответом иммунной системы на аллерген и сопровождается выраженной активацией ряда воспалительных клеток. Полученные нами результаты увеличения содержания моноклеарных клеток HLA-DR+ соответствуют данному положению. В то же время установленное нами повышение сывороточной концентрации молекул sHLA-DR, возможно, связано с ограничением избыточной активации клеток-участниц воспаления, что обеспечивает ингибирование аллергической реакции. Известно, что растворимые молекулы HLA II класса способны блокировать функциональную активность Т-хелперов, связываясь с CD4-рецептором на лимфоцитах. Следствием является торможение стимуляции моноцитов / макрофагов и В-лимфоцитов, осуществляемое при реализации иммунного ответа с участием Т-хелперов [3].

Для оценки связи между патофункциональными проявлениями БА и уровнем экспрессии молекул адгезии и главного комплекса гистосовместимости был проведен анализ корреляционных взаимоотношений между содержанием тестированных растворимых антигенов, антиген-положительных клеток и величиной коэффициента МОС (максимальная объемная скорость выдоха). Как известно, МОС является одним из показателей ФВД и регистрирует

Таблица
Сывороточное содержание растворимых молекул адгезии, гистосовместимости и относительного количества моноклеарных лейкоцитов ICAM+, HLA+ у детей с БА

Показатели	Группа контроля (n = 16)	Группа с БА (I + II + III степени тяжести)	1-я группа (БА I степени тяжести)	2-я группа (БА II степени тяжести)	3-я группа (БА III степени тяжести)
CD50+, %	57,6 ± 4,3	39,9 ± 2,6; $p_1 \leq 0,05$	42,1 ± 7,6	36,2 ± 2,8; $p_1 \leq 0,05$	46,9 ± 4,7
sCD50, U/ml	236,0 ± 33,4	488,1 ± 97,4; $p_1 \leq 0,05$	242,7 ± 79,3	472,0 ± 65,7; $p_1 \leq 0,05$	725,9 ± 210,9
CD54+, %	46,2 ± 5,6	24,6 ± 2,0; $p_1 \leq 0,05$	40,5 ± 4,0	27,4 ± 2,3; $p_1 \leq 0,05; p_2 \leq 0,05$	18,0 ± 3,3; $p_1 \leq 0,05; p_2 \leq 0,05; p_3 \leq 0,05$
sCD54, U/ml	39,1 ± 5,6 $p_1 \leq 0,05$	77,2 ± 12,5;	32,4 ± 6,3	76,6 ± 11,9; $p_1 \leq 0,05$	117,1 ± 26,5; $p_1 \leq 0,05; p_2 \leq 0,05$
HLA I+, %	74,6 ± 8,9	57,5 ± 3,7	58,4 ± 7,3	55,0 ± 5,1	61,3 ± 4,4
sHLA I, U/ml	921,5 ± 221,0	763,8 ± 172,6	1 334,2 ± 712,3	671,6 ± 132,2	537,5 ± 62,1
HLA DR+, %	22,7 ± 2,9	36,4 ± 2,5; $p_1 \leq 0,05$	38,7 ± 6,9; $p_1 \leq 0,05$	32,4 ± 2,3; $p_1 \leq 0,05$	41,3 ± 4,1; $p_1 \leq 0,05; p_2 \leq 0,05$
sHLA DR, U/ml	99,5 ± 12,5	290,1 ± 47,6; $p_1 \leq 0,05$	116,2 ± 36,4	302,0 ± 45,2; $p_1 \leq 0,05$	425,9 ± 77,1; $p_1 \leq 0,05; p_2 \leq 0,05$

Примечание: p_1 — различия достоверны по сравнению с группой контроля; p_2 — различия достоверны по сравнению с 1-й группой; p_3 — различия достоверны по сравнению со 2-й группой.

степень проходимости крупных (МОС₂₅), средних (МОС₅₀) и мелких (МОС₇₅) бронхов [10]. В результате было выявлено, что увеличение сывороточной концентрации sICAM-1 антигена у детей, больных БА, связано со снижением проходимости средних бронхов ($r = -0,71$; $p < 0,05$). Увеличение уровня HLA-DR-положительных клеток и растворимых HLA-DR антигенов связано с усилением обструкции средних и мелких бронхов ($r = -0,67$; $p < 0,05$; $r = -0,73$; $p < 0,05$ соответственно).

В связи с этим сывороточное содержание растворимых антигенов sICAM-1, sHLA-DR и содержание HLA-DR-положительных клеток крови могут быть использованы в качестве комплекса дополнительных показателей тяжести БА и выраженности бронхообструкции у детей.

Литература

1. Чучалин А.Г. (ред.). Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. М.: Изд-во "Атмосфера"; 2002.
2. Федосеев Г.Б. (ред.). Бронхиальная астма. СПб.: Мед. информ. агентство; 1996.
3. Poehlau D., Kiltz U., Rieks M. et al. Therapeutic immunoadsorption increases the level of circulating soluble HLA molecules. *Vox. Sang.* 2000; 78 (2): 119–121.
4. Carrasco Y.R., Fleire S.J., Cameron T. et al. LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity* 2004; 20 (5): 589–599.
5. Jenks S.A., Miller J. Inhibition of IL-4 responses after T cell priming in the context of LFA-1 co-stimulation is not reversed by re-stimulation in the presence of CD28 co-stimulation. *J. Immunol.* 2000; 164: 72–78.
6. Contini P., Ghio M., Poggi A. et al. Soluble HLA-A,-B,-C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33 (1): 125–134.
7. Spaggiari G.M., Contini P., Dondero A. et al. Soluble HLA class I induces NK cell apoptosis upon the engagement of killer-activating HLA class I receptors through FasL-Fas interaction. *Blood* 2002; 100 (12): 4098–4107.
8. Новиков В.В. Растворимые формы дифференцированных антигенов гемопоэтических клеток. *Гематология и трансфузиология* 1996; 6: 40–43.
9. Mauri-Hellweg D., Bettens F., Mauri D. Activation of drug-specific CD4+ and CD8+ T cells in individuals allergic to sulfonamides, phenytoin, and carbamazepine // *The Journal of Immunology* 1995; 155 (1): 462–472.
10. Баранов В.Л., Куренкова И.Г., Казанцев В.А. Исследование функции внешнего дыхания. СПб.: Элби-СПб; 2002.

Поступила 16.12.05

© Коллектив авторов, 2007

УДК 616.248-053.2-07:616.24-092