

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической  
иммунологии»

*На правах рукописи*



МАКАРОВА АННА ЕВГЕНЬЕВНА

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ПАЦИЕНТОВ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В ДИНАМИКЕ  
ИММУНОТЕРАПИИ АУТОЛОГИЧНЫМИ АКТИВИРОВАННЫМИ  
Т-ЛИМФОЦИТАМИ**

3.2.7. Иммунология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор,  
академик РАН Козлов В.А.

Новосибирск – 2026

## Оглавление

Введение .....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	14
1.1 Этиопатофизиологические особенности бронхиальной астмы .....	14
1.2 Современное представление о патогенезе БА .....	20
1.2.1 Генетические аспекты .....	20
1.2.2 Основы патогенеза .....	21
1.2.3 Участие регуляторных Т-клеток .....	24
1.2.4 Субпопуляции В-клеток .....	29
1.2.5 Врожденные лимфоидные клетки (ILC) .....	30
1.2.6 Роль PD-1 (programmed death-1) и его лигандов .....	32
1.3 Фармакотерапия БА. Основные принципы лечения .....	33
1.4 Иммуноterapia .....	39
1.4.1 Антиэрготипический ответ .....	41
1.4.2 Участие антиидиотипического и антиэрготипического ответа в аллергических и аутоиммунных патологиях .....	42
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	44
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	55
3.1 Характеристика иммунологического и клинического статуса пациентов с БА до лечения .....	55
3.2 Характеристика аутологичных активированных Т-клеток пациентов с БА, предназначенных для терапии .....	57
3.3 Переносимость иммунотерапии .....	59
3.4 Динамика показателей иммунного статуса у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА в ходе иммунотерапии активированными Т-лимфоцитами, в сравнении с пациентами с аллергической формой БА, получавшими стандартное лечение .....	60
3.4.3 Сравнительная характеристика уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови групп пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение .....	62
3.4.5 Оценка динамики фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА в процессе иммунотерапии .....	64
3.5 Динамика маркеров активации HLA-DR, CD25 и PD-1 на CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> лимфоцитах и количество регуляторных Т-клеток у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА при проведении иммунотерапии, в сравнении с пациентами на стандартном лечении и с донорами .....	65
3.6 Динамика относительного количества субпопуляций В-клеток и экспрессии CD23 у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА при иммунотерапии и стандартном лечении в сравнении с донорами .....	69

3.7 Определение содержания перфорина и гранзима В в CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> лимфоцитах у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА в динамике иммунотерапии и стандартного лечения в сравнении с донорами.....	72
3.8 Динамика клинических параметров у пациентов в ходе терапии активированными Т-лимфоцитами у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА и стандартном лечении.....	74
3.8.3 Динамика показателей по опроснику АСQ5 у групп пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение .....	76
3.8.5 Динамика оценки качества жизни по данным опросника AQLQ(s) у групп пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение .....	77
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	92
ВЫВОДЫ.....	94
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	98

## Введение

### Актуальность исследования

Во всем мире около 348 млн пациентов страдают бронхиальной астмой (БА) [1]. В России на 2022 год с диагнозом БА числилось 1591 тыс. пациентов. По данным исследования GARD (Глобальный альянс против хронических респираторных заболеваний), процент пациентов с симптомами, связанными с астмой, составил 25,7% от всех хронических респираторных заболеваний [2].

Патогенез БА представляет собой сложный механизм, включающий участие генетических факторов, клеток врожденного и адаптивного иммунитета, эпителиальных барьеров, цитокинов, нейромедиаторов и других элементов, формирующих разные фенотипы и эндотипы болезни. В основе различных эндотипов БА лежат иммуновоспалительные механизмы, выделяют эндотипы с высоким Th2 воспалением, низким Th2 воспалением и смешанные [3]. Для Th2 фенотипа характерно смещение баланса Th1- и Th2-опосредованных иммунных реакций в сторону преобладания Th2-пути, что является ключевым фактором формирования предрасположенности к развитию реакций гиперчувствительности немедленного типа [4]. В большинстве случаев аллергической БА развивающийся в нижних дыхательных путях Th2-иммунный ответ составляет основу иммунологических нарушений [1]. В формировании Th2-независимого воспаления задействованы два основных механизма: доминирование Th1-зависимого ответа с высоким уровнем интерферона- $\gamma$  (INF $\gamma$ ) в мокроте и интерлейкин-17 (IL-17)-обусловленный механизм. У пациентов с доминированием Th1 ответа Th1-клетки продуцируют не только большое количество INF $\gamma$ , но и фактор некроза опухоли (TNF) и IL-1, которые принимают участие в реализации гиперчувствительности замедленного типа, способствующей повреждению тканей [4].

Развитию аллергических реакций помимо преобладания функциональной активности Th2-клеток на фоне сниженной активности Th1-клеток и оказываемого ими влияния на иммунологические процессы, служит как дефицит, так и ослабление функции регуляторных T-клеток (Treg) [5]. К прямым и

косвенным мишеням регуляторных Т-клеток относятся все участники аллергических процессов: дендритные клетки, Т-хелперы, В-лимфоциты, клетки-продуценты иммуноглобулина Е (IgE), тучные клетки, базофилы и нейтрофилы, а также макрофаги и NK-клетки [6]. Помимо контактного действия, Treg обеспечивают иммуносупрессию посредством продукции супрессорных цитокинов, конкурентным связыванием IL-2 за счет высокой экспрессии  $\alpha$ -цепи рецептора, цитолизом, понижением экспрессии костимуляторных молекул и антигенной презентации на антиген-презентирующих клетках [7].

Препараты, применяемые в лечении БА, направлены на иммуносупрессию, а также нейтрализацию основных медиаторов воспаления. Лечение БА, в соответствии со ступенчатым принципом, включает 5 ступеней, которые подразумевают использование  $\beta$ 2-адреномиметиков, ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС), антилейкотриеновых препаратов, тиотропия бромида и генно-инженерных биологических препаратов (ГИБП), в том числе моноклональных антител против IgE, рецептора IL-5, также препараты, избирательно связывающие интерлейкин-5 и ингибирующие передачу сигналов как от IL-4, так и от IL-13. Большинство пациентов, страдающих БА, хорошо отвечают на традиционную терапию, однако, существенная часть больных (20-30%) рефрактерны к стандартной терапии, что может быть связано с низкой приверженностью к терапии, невозможностью исключения контакта с аллергенами, с вредными привычками и другими факторами [8].

Недостаточная эффективность стандартных протоколов лечения больных бронхиальной астмой послужила основанием для поиска новых направлений системной терапии данного заболевания. Одним из таких направлений является клеточная иммунотерапия, нацеленная на активацию антиэрготипического ответа. Данный тип ответа относится к Т-Т-клеточным взаимодействиям, индукция антиэрготипических и антиидиотипических Т-клеток происходит при введении в организм активированных антигеном Т-лимфоцитов. Так, было показано, что антиидиотипические Т-клетки распознают клоноспецифические детерминанты, а антиэрготипические - антигенные детерминанты, связанные с маркерами

активации (эрготопы) [9, 10]. К эрготопам относится, например, молекула CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора IL-2), экспрессируемая активированными Т-клетками. Поздний маркер активации Т-клеток – HLA-DR - рассматривают в качестве эрготоп-ассоциированной молекулы, так как представление эрготопа Т-клеткам должно осуществляться в составе молекул главного комплекса гистосовместимости [11].

Впервые иммунизация, нацеленная на усиление природной антиэрготипической регуляторной сети, была применена в экспериментальных моделях для лечения аутоиммунных заболеваний, для которых предварительно было показано снижение антиэрготипического ответа [12]. Такое воздействие оказалось успешным. Введение антиэрготипических клеток или иммунизация самими эрготопами, или полноразмерными последовательностями ДНК, кодирующими эти молекулы, снижало проявления таких аутоиммунных заболеваний, как адьювантный артрит и экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит [13].

Был разработан метод лечения аллергических заболеваний, основанный на индукции антиэрготипического ответа путем введения активированных аутологичных Т-клеток. Успешное применение активированных аутологичных Т-клеток с целью индукции антиэрготипического ответа в качестве терапии было показано на пациентах с атопическим дерматитом. Данное исследование является продолжением цикла работ, проводившихся по этой теме. Введение активированных Т-лимфоцитов способствует активации собственных Т-регуляторных клеток, ГЗТ-эффекторов, цитотоксических Т-лимфоцитов [14]. Положительное воздействие Т-клеточной иммунотерапии выразилось в достоверном клиническом улучшении и усилении естественных механизмов регуляции: снижении пролиферации антиген-специфических клеток, влиянии на созревание и дифференцировку наивных Т-клеток, изменении продукции цитокинов Th1- и Th2-клетками и, соответственно, приводило к уменьшению выраженности аллергических реакций [15].

Таким образом, использование аутологичных активированных Т-лимфоцитов в терапии бронхиальной астмы представляет клинический интерес.

## **Степень разработанности темы исследования**

Метод индукции антиэрготипического ответа путем введения активированных аутологичных Т-клеток широко изучался как в отечественных, так и в зарубежных исследованиях. Значительная часть работ была сосредоточена на влиянии такой терапии на аутоиммунные заболевания, демонстрируя свой потенциал как в доклинических, так и клинических исследованиях. Кроме того, разработка и применение активированных аутологичных Т-клеток также исследовались при атопическом дерматите. Этот подход является перспективным. Несмотря на значительный прогресс в этой области, многие вопросы остаются открытыми. В частности, недостаточно изучено использование аутологичных активированных Т-лимфоцитов в терапии бронхиальной астмы разных форм. Представленная работа была посвящена решению указанных вопросов.

## **Цель и задачи исследования**

### **Цель работы:**

Изучить влияние терапии активированными аутологичными Т-лимфоцитами в сочетании со стандартным лечением на иммунологические и клинические показатели пациентов с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы.

### **Основные задачи:**

1. Охарактеризовать клетки, активированные ИЛ-2 и анти-CD3 антителами *in vitro*, вводимые пациентам с бронхиальной астмой, по количеству CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т-регуляторных клеток и CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25, HLA-DR.

2. Исследовать параметры иммунного статуса пациентов с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы в динамике лечения активированными аутологичными Т-лимфоцитами в сочетании со стандартной терапией и пациентов с аллергической формой БА, получающих только стандартное лечение.

3. Исследовать изменения количества  $CD4^+CD25^+CD127^-$  Т-регуляторных клеток и относительного содержания  $CD4^+$  и  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, экспрессирующих  $CD25$ , HLA-DR, PD-1, у пациентов с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы в динамике комбинированной терапии, пациентов с аллергической формой БА, получающих только стандартное лечение и условно-здоровых доноров.

4. Оценить субпопуляционный состав В-лимфоцитов (В1, В2 клетки) и относительное содержание В-клеток, экспрессирующих  $CD23$  (низкоаффинный рецептор IgE) у пациентов с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы в динамике комбинированной терапии, у пациентов с аллергической формой БА, получающих только стандартное лечение и условно-здоровых доноров.

5. Оценить относительное содержание  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулы перфорина и гранзима В, у пациентов с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы в динамике комбинированной терапии, у пациентов с аллергической формой БА, получающих только стандартное лечение и условно-здоровых доноров.

6. Исследовать переносимость и оценить изменения клинических параметров (функция внешнего дыхания, опросники по уровню контроля астмы и качеству жизни) с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы в динамике комбинированной терапии, у пациентов с аллергической формой БА, получающих только стандартное лечение.

### **Научная новизна**

Впервые были получены данные о влиянии терапии с применением активированных аутологичных Т-лимфоцитов в сочетании со стандартной терапией на иммунологические и клинические показатели пациентов с бронхиальной астмой. У пациентов с БА, получающих комбинированную терапию, впервые было продемонстрировано достоверное увеличение относительного содержания  $CD4^+$  клеток, экспрессирующих  $CD25$  весь период

наблюдения, при этом количество  $CD4^{+}25^{+}127^{-}$  Т- регуляторных клеток в процессе комбинированного лечения не изменялось и сохранялось на уровне здоровых доноров.

При оценке показателей гуморального звена было впервые показано, что при применении комбинированного лечения у пациентов с аллергической формой БА регистрировалось снижение количества В-лимфоцитов, экспрессирующих CD23, снижение уровня общего IgE. У пациентов с неаллергической формой БА уровень В-лимфоцитов, экспрессирующих CD23, как до, так и в процессе комбинированного лечения не отличался от доноров. Установлено, что по содержанию субпопуляций В-лимфоцитов В1 ( $CD19^{+}CD5^{+}$ ), В2 ( $CD19^{+}CD5^{-}$ ) аллергическая и неаллергическая формы бронхиальной астмы не отличались друг от друга.

Впервые было продемонстрировано, что на стандартной терапии у пациентов с аллергической формой БА происходило достоверное увеличение количества  $CD8^{+}$ -клеток, экспрессирующих перфорин и гранзим В.

В динамике комбинированной терапии у пациентов с аллергической формой БА наблюдалось улучшение функции внешнего дыхания, увеличивается уровень контроля над астмой по опроснику ACQ5, при этом повышение качества жизни по опроснику AQLQ(s) отмечалось у пациентов не только с аллергической, но и неаллергической формами БА.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Введение аутологических Т-лимфоцитов, активированных с помощью рекомбинантного человеческого IL-2 и анти-CD3 антител, показало возможность влияния на показатели иммунного ответа, выражающееся в изменении количества Т-клеток, экспрессирующих эрготоп-ассоциированные маркеры, количества В-клеток, позитивных по CD23.

Практическая значимость работы заключается в новом подходе к терапии БА, который, в сочетании со стандартной терапией, оказывает корригирующее влияние на иммунологические параметры, IgE-опосредованные реакции у

пациентов с аллергической формой БА, положительно влияет на качество жизни пациентов, как с аллергической, так и с неаллергической формой БА.

Разработан протокол комбинированной терапии на основе введения активированных аутологичных Т-клеток в сочетании со стандартной терапией (Патент РФ на изобретение №2652752/28.04.2018 Бюл. №13), который может быть востребован в терапии пациентов с БА для иммунокорригирующего воздействия.

### **Методология и методы исследования**

Диссертационная работа основана на результатах клинико-иммунологического обследования больных бронхиальной астмой, находившихся на стационарном или амбулаторном лечении в аллергологическом отделении. Исследования выполнены в рамках поисковых научно-исследовательских работ лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ. Объектом исследования были 30 пациентов с аллергической и неаллергической формой бронхиальной астмы и 13 условно здоровых доноров. Предмет исследования - изучение влияния активированных аутологичных Т-клеток в сочетании со стандартной терапией на иммунологические и клинические параметры у пациентов с БА.

Активированные аутологичные Т-клетки получали при культивировании МНК в присутствии анти-CD3 антител и IL-2. Проводилось определение количества лимфоцитов, популяционного состава лимфоцитов, относительного количества субпопуляций В-клеток и экспрессии молекулы CD23, содержание перфорина и гранзима В в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитах, определение уровня экспрессии HLA-DR, CD25 и PD-1 на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоцитах и регуляторных Т-клетках с помощью проточной цитофлуориметрии. Определение уровня иммуноглобулинов сыворотки определялся на иммунохимическом анализаторе. Исследование фагоцитоза проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора Phagotest. Оценка функции внешнего дыхания оценивалась с помощью инструментального обследования - спирометрии и пробы с бронхолитиком. Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием статистической программы Statistica (StatSoft),

версия 6.0. Оценка проводилась до начала терапии, через 2 месяца и по окончании терапии через 7 месяцев.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Активированные аутологичные Т-лимфоциты являются фактором, индуцирующим увеличение эрготоп-ассоциированных Т-клеток при неизменном уровне CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т- регуляторных клеток у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА.
2. Комбинированная терапия обуславливает снижение субпопуляций В-лимфоцитов, экспрессирующих низкоаффинный рецептор IgE, и уровня общего IgE у пациентов с аллергической формой БА.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, результатов собственных исследований, отраженных в восьми главах, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материал изложен на 119 страницах машинописного текста, включающего 12 таблиц и 2 рисунка. Работа выполнена на базе лаборатории клинической иммунопатологии НИИФКИ, а также аллергологического отделения Клиники иммунопатологии НИИФКИ в рамках поискового научного исследования (рег.№ 0540-2017-0002).

### **Степень достоверности и личное участие автора**

Достоверность полученных результатов подтверждается продуманным алгоритмом работы, достаточной выборкой исследования, использованием современных иммунологических методов анализа и адекватных методов статистической обработки. Результаты, представленные в данной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор участвовал в рекрутировании пациентов, проведении иммунологических исследований, статистической обработке результатов и интерпретации экспериментальных данных.

### **Апробация материалов**

Материалы исследования доложены и обсуждены на отчетных конференциях аспирантов НИИФКИ в 2016, 2017, 2021, 2022 гг. Результаты исследования были представлены в виде постерного доклада в 2016 г. на конференции World Allergy Organization Journal International scientific conference, г. Иерусалим, Израиль; в виде устного доклада в 2018 г. на XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Перспективы развития фундаментальных наук, г. Томск, Россия.

Апробация диссертации состоялась 02 декабря 2025 г. на семинаре клинического отдела Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» (НИИФКИ).

### **Внедрение результатов в практику**

Основные результаты и выводы работы внедрены в учебный и научный процесс в НИИФКИ (лекции для ординаторов) и НГУ (курсы «Клеточные технологии в иммунотерапии»). Выявленное снижение относительного количества CD23<sup>+</sup> В-лимфоцитов можно рассматривать в качестве потенциального биомаркера эффективности иммунотерапии у пациентов с аллергической бронхиальной астмой, что может послужить основой для разработки в дальнейшем новых методов прогноза ответа на терапию.

### **Публикации по теме исследования**

По теме диссертации опубликовано 9 научных работ, включая 3 статьи в журналах, в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования Российской Федерации для публикаций основных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.2.7. Иммунология, и патент.

## **Благодарности**

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.м.н., профессору, академику Владимиру Александровичу Козлову за помощь, оказанную при работе над диссертацией. Также выражается огромная благодарность сотрудникам лаборатории клинической иммунопатологии: к.б.н. Елене Андреевне Блиновой, к.б.н. Екатерине Александровне Пашкиной, к.б.н. Любовь Викторовне Гришиной за неоценимую поддержку, помощь и веру в благополучный исход. Автор благодарен врачам отделения: к.м.н. Дарье Владимировне Деминой, Вере Макаровне Непомнящих, Марине Ивановне Леоновой и заведующей лабораторией клинической иммунологии Пронкиной Наталье Викторовне.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Этиопатофизиологические особенности бронхиальной астмы

Бронхиальная астма (БА) является гетерогенным заболеванием, характеризующимся хроническим воспалением дыхательных путей, наличием респираторных симптомов, таких как свистящие хрипы, одышка, заложенность в груди и кашель, которые варьируют по времени и интенсивности и проявляются вместе с вариабельной обструкцией дыхательных путей [1].

За последние десятилетия значительно возросло число больных бронхиальной астмой, это одно из самых распространенных хронических заболеваний в мире. Распространенность БА составляет от 1 до 18% больных в разных странах на долю населения. Признаков тенденции к снижению заболеваемости БА на данный момент нет, наоборот, распространенность астмы во многих частях мира все еще увеличивается [16]. В Швеции было проведено исследование динамики заболеваемости астмой за последние 20 лет, в котором отмечалось, что количество заболевших увеличилось с 8,4% в 1996 г. до 10,9% в 2016 г. В том числе аллергическая астма увеличилась с 5,0% в 1996 г. до 7,3% в 2016 г., при этом распространенность неаллергической астмы оставалась на стабильном на уровне 3,4–3,8% [17].

В Российской Федерации, согласно эпидемиологическим исследованиям 2014 года, распространенность хронической бронхолёгочной патологии колебалась от 17% до 21%, среди которой от 6% до 8% составляли взрослые и 12%– дети больные бронхиальной астмой [19]. Для оценки распространенности респираторных заболеваний в 2017 году в нескольких регионах Российской Федерации было проведено исследование с использованием опросника GARD (Global alliance against chronic respiratory disease - Глобальный альянс против хронических респираторных заболеваний). По данным исследования, распространенность респираторных симптомов в выборке населения была высокой. Процент пациентов с симптомами, связанными с астмой, составил 25,7% [18].

За последние годы были получены надежные данные по распространенности симптомов болезни во многих странах мира по программе ISAAC (International study of asthma and allergies in childhood – Международное изучение БА и аллергических заболеваний у детей). В нашей стране первое исследование, выполненное по опросникам ISAAC, было проведено в Новосибирске. При анализе данных оказалось, что на симптомы бронхиальной астмы жаловались 23,4% детей в возрасте 13–14 лет, и отмечали родители 27,8% детей в возрасте 6–7 лет. При этом диагноз бронхиальной астмы учреждениями практического здравоохранения был зафиксирован у детей только в 2,4%, что свидетельствует о регистрации в основном тяжелых форм заболевания [20].

Смертность от БА в мире за последние 20 лет существенно снизилась с 25 до 13 человек у мужчин и с 17 человек до 9 у женщин на 100 тыс. больных [21]. Смертность от БА в России в 1990-х составляла 4,0–4,8 на 100 тыс. больных, а в 2007 г. – 0,25 на 100 тыс. больных [22]. Основными факторами, снизившими глобальную смертность от БА, являются применение в качестве противовоспалительной терапии ингаляционные глюкокортикостероидные средства (ИГКС) и внедрение международных клинических рекомендаций по лечению БА [22]. При анализе случаев смерти в Великобритании, были выявлены такие моменты: 50% умерших были с БА легкой или средней степени тяжести; только 23% умерших людей имели индивидуальный план лечения по контролю за астмой; 47% не обратились к терапевту для коррекции терапии после обращения за неотложной помощью из-за приступа БА; 39 % злоупотребляли короткодействующими  $\beta_2$ -агонистами (КДБА); 49% не следили за триггерными факторами, влияющими на обострение БА; 56% имели лишний вес; 28% курильщики [23]. Также одним из факторов смертности является низкая приверженность пациентов к терапии [24]. Снижение использования неотложной медицинской помощи, о котором сообщается в некоторых экономически развитых странах, отражает улучшение качества медицинской помощи. Тем не менее, так как нет тенденции к снижению заболеваемости, в ближайшем будущем

специалистам здравоохранения необходимо и дальше рассчитывать на высокие уровни расходов в связи с оказанием помощи при астме [25].

Этиологические факторы подразделяются на прямые и косвенные. К прямым относится, так называемая гигиеническая теория, смысл которой заключается в уменьшении воздействия микробных стимулов на иммунную систему ребенка и в дальнейшем преобладание развития иммунного ответа с участием Th2-клеток, что может провоцировать развитие аллергии [26].

В 1997 и 2007 годах были проведены два исследования с идентичной методологией по распространенности атопических заболеваний в финской и российской Карелии. В результате было установлено, что частота сенсibilизации к аллергенам в Финляндии увеличивалась у детей с последующими годами рождения, но оставалась стабильной в России. Различия в заболеваемости авторы связывают с улучшением уровня жизни в Финляндии [27].

Дети, растущие в среде, которая подвергает их воздействию широкого спектра микробов, например в сельской местности, менее подвержены развитию астмы и атопии. В двух перекрестных исследованиях дети, жившие в селе, имели более низкую заболеваемость БА и атопией и подвергались воздействию большего количества окружающих микроорганизмов, чем дети из контрольной группы, проживающих в городской среде [28]. Разнообразные микробные патогены запускают врожденный иммунный ответ с последующей индукцией клеток Th1 типа, которые могут активироваться и уравновешивать преобладание Th2 типа, что характерно для астмы. Иммуитет слизистой оболочки также может играть специфическую роль в регулировании баланса Th1/Th2 типа [28]. Также было опубликовано интересное предположение, которое заключалось в том, что проживание матери в сельской местности может оказывать потенциальное воздействие микробными стимулами на ребенка и формировать иммунную систему на ранней стадии, отмечается увеличение количества и функции Treg пуповинной крови, с чем связана более низкая секреция цитокинов Th2 и пролиферация лимфоцитов [29]. Исследование о влиянии воздействия загрязнителей воздуха на функцию легких показало, что в группе взрослых

астматиков ухудшение функции легких связано с воздействием газообразных загрязнителей и происходит при уровнях CO и SO<sub>2</sub> ниже действующих европейских стандартов [30].

Установлено, что использование антибиотиков на первом году жизни связано с повышенным риском развития астмы до трехлетнего возраста. Данная взаимосвязь имела четкую зависимость от количества проведенных курсов: при 5 или более курсов антибиотиков риск развития астмы удваивался. При этом не было связи между применением антибиотиков и поздним началом астмы [31].

Анализ роли аллергических реакций в патогенезе БА показывает гетерогенность этих реакций, формирующих разные фенотипы астмы. Было выявлено несколько различных вариантов иммунозависимых аллергических реакций как с наличием IgE-антител в крови, так и с участием антител других изотипов и/или сенсibilизации лимфоцитов. Что свидетельствовало о том, что атопическая астма может реализовываться без IgE-зависимого механизма [32]. В соответствии с номенклатурой аллергических болезней, предложенной ЕААСI, БА, опосредованную иммунологическими механизмами, с доказанным участием IgE-антител в формировании заболевания следует обозначать как аллергическую БА. Бронхиальная астма, в патогенезе которой не участвуют IgE-антитела, является не-IgE-обусловленной или неаллергической [3, 4, 33].

Объективными различиями указанных фенотипов БА являются положительные кожные пробы с аллергенами и установленная причинная связь клинических симптомов с выявленными аллергенами. Примером неаллергической БА служит аспириновая БА. Еще один этиологический фенотип – профессиональная БА, которая в большинстве случаев относится к IgE-опосредованной аллергической БА, так как большинство профессиональных сенсibilизаторов являются аллергенами, способными вызывать специфический IgE-ответ. Профессиональные агенты, простые химические вещества с низкой молекулярной массой, являются ирритантами (соли никеля, платины, формальдегид и др.) и могут вызывать развитие бронхиальной гиперреактивности и формирование БА, индуцированной ирритантами [34].

В зависимости от фенотипа БА подразделяется на астму с поздним дебютом; БА с фиксированной обструкцией дыхательных путей; БА у больных с ожирением. В последних совместных клинических рекомендациях Европейского респираторного общества и Американского торакального общества предлагается разделять БА отдельно на трудно контролируемую и тяжелую [35]. Трудная для лечения БА это астма, которая не контролируется, несмотря на лечение на ступени 4 или 5 по GINA (Global initiative for asthma - Глобальная инициатива по астме); или, для которой требуется такое лечение для поддержания хорошего контроля симптомов и уменьшения риска обострений. Во многих случаях БА может быть трудной для лечения из-за модифицируемых факторов, таких как: неправильная техника ингаляции, плохая приверженность лечению, курение или сопутствующие заболевания, или из-за неправильного диагноза. Тяжелая астма является подгруппой трудно поддающейся лечению астмы и обозначает астму, которая остается неконтролируемой, несмотря на приверженность максимально оптимизированной терапии и лечению сопутствующих заболеваний, или ухудшается, когда высокие дозы ГКС уменьшаются [1].

В зависимости от степени тяжести клинических проявлений впервые выявленной бронхиальной астмы выделяют 4 категории: интермиттирующая БА, легкая персистирующая БА, персистирующая БА средней тяжести, тяжелая персистирующая БА. Определяется по таким критериям как: количество дневных и ночных симптомов, частота и длительность обострений, физическая активность, уровень объема форсированного выдоха за первую секунду ( $ОФВ_1$ ) или пиковая скорость выдоха (ПСВ) [1]. Когда пациент в течение 3 месяцев получает терапию, то тяжесть БА оценивается в зависимости от степени терапии, которой контролируется БА.

По уровню контролируемости бронхиальная астма делится на 3 группы: контролируемая, частично контролируемая и неконтролируемая. Оценка контроля симптомов БА проводится на основании клинических признаков за последние 4 недели. Определяется по таким критериям как: наличие дневных симптомов, ночных пробуждений, потребность в препарате для купирования, любое

ограничение активности из-за БА. Существуют специальные опросники и шкалы, например ACQ5, ACQ7 (Asthma control questionnaire–Вопросник по контролю над астмой) и АСТ (Asthma control test– тест по контролю над астмой), проведены сравнительные исследования и соответствия критериям GINA. Проводилось сравнение текущего контроля астмы, определенного критериями ACQ и АСТ, с классификацией GINA у пролеченных пациентов в реальных условиях. Контроль астмы оценивался с использованием классификации GINA как «истина» и ACQ7, ACQ5 и АСТ в качестве критериев «предсказания». ACQ5, ACQ7 и АСТ правильно предсказали неконтролируемую астму по GINA [36].

Безусловно, вся тяжелая БА, рефрактерная к терапии ИГКС и длительно действующими  $\beta_2$ -агонистами (ДДБА), как правило, будет являться неконтролируемой. Однако далеко не вся трудно контролируемая БА является тяжелой. Так, по данным ряда исследователей, трудно контролируемая БА более чем в 50% случаев обусловлена неправильной техникой ингаляции и нарушением режима приема препаратов [37].

Характер инфильтрации можно использовать для идентификации различных воспалительных эндотипов при астме. Признанные эндотипы с исследованием индуцированной мокроты – это эозинофильная, нейтрофильная, смешанная гранулоцитарная и Раусі-гранулоцитарная астма. У населения риск астмы из-за эозинофильного воспаления составляет около 50% и около 50% представляет собой астму, связанную с незозинофильными процессами. Знание воспалительного фенотипа необходимо, поскольку оно связано с ответом на лечение, патогенетическими механизмами, участвующими в развитии заболевания, и дальнейшим прогнозом заболевания. Выявлена ассоциация селективной эозинофилии мокроты с клиническим ответом на кортикостероиды. Применение анализа воспалительного эндотипа астмы позволит осуществить персонализированный подход к терапии больных БА [38].

## 1.2 Современное представление о патогенезе БА

### 1.2.1 Генетические аспекты

При сравнении частоты БА среди потомков здоровых людей и лиц с БА установлено, что риск развития заболевания в 2,6 раза выше, если БА страдает мать ребенка, в 2,5 раза выше, если болеет отец, и в 6,7 раза выше, если болеют оба родителя. Следует подчеркнуть, что риск развития БА у ребенка в случае, когда болеют оба родителя, значительно превышает таковой при наличии заболевания у одного из них. Причем, что особенно важно, он не является простой суммой рисков, полученных от каждого из родителей. Эти результаты, вероятно, отражают аддитивное взаимодействие многих генов, обуславливающих предрасположенность к развитию БА. В ряде исследований показано, что при манифестации БА в раннем возрасте она протекает более тяжело и быстрее приводит к необратимым изменениям в легких; риск развития заболевания у последующих детей существенно возрастает; кроме того, наследственная отягощенность в этих семьях проявляется большим количеством лиц с субклиническими проявлениями болезни [39].

Гены-кандидаты, ответственные за развитие БА, расположены на хромосомах 2, 4, 7, в кластере цитокинов на хромосоме 5 и на хромосоме 6 в области МНС. Гены атопии или гуморального иммунного ответа локализованы в участках хромосомы 5q24-33 и содержат кластер семейства генов цитокинов (IL-4, IL-5, IL-13, IL-3, GM-CSF), ответственный за развитие реакций немедленного типа.

В целом установлено, что в патогенезе БА участвует множество генов, среди которых выделяют несколько крупных групп [40, 41]:

1. Гены, кодирующие факторы антигенного распознавания и гуморального иммунного ответа. Среди них связь с БА показана для генов интерлейкинов (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), генов главного комплекса гистосовместимости (HLA-B, HLA-DR),  $\alpha$ -субъединицы антигенного рецептора Т-клеток (TCR).

2. Гены медиаторов воспаления, хемокинов и молекул межклеточной адгезии. К данной группе относятся гены лейкотриенов C4 (LTC4S), фактора

активации тромбоцитов (PAF), синтазы оксида азота (NOS1, NOS2, NOS3), 5-липоксигеназы (LOX5), фактора высвобождения гистамина (HRF) и др.

3. Гены рецепторов, осуществляющих фиксацию внешних молекул-лигандов на клетках-мишенях, такие как гены  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-4 (IL4RA),  $\alpha$ -цепи рецептора ИЛ-5 (IL5RA), рецептора глюкокортикоидов (GRL),  $\beta$ -цепи адренергического рецептора (ADRB2),  $\beta$ -цепи высокоаффинного рецептора IgE (FCER1B), рецептора серотонина (HTR2A).

4. Гены внутриклеточных сигнальных молекул и факторов транскрипции: гены тирозинкиназы 1 семейства Jak (JAK1), тирозинкиназы 3 семейства Jak (JAK3) трансммиттера сигнала и активатора транскрипции 6 (STAT6),  $\beta$ -субъединицы ядерного фактора транскрипции Y (NFYB), субъединицы 1 ядерного фактора транскрипции NF-kB (NFKB1).

5. Прочие гены, например гены биотрансформации ксенобиотиков (NAT2, CYP1A, GSTT1, GSTM1).

Одни из этих генов связаны с предрасположенностью к развитию БА, а другие коррелируют с ответом на лечение противоастматическими препаратами. Так, например, показана разная чувствительность пациентов к лечению  $\beta$ 2-агонистами в зависимости от полиморфизма гена ADRB2 и лечению глюкокортикостероидами в зависимости от полиморфизма гена GRL [40, 42].

### 1.2.2 Основы патогенеза

Астма – это гетерогенное заболевание с различными типами воспалительных процессов. Можно выделить, как минимум, два различных молекулярных фенотипа, которые определяются содержанием Th2-клеток. Это подтверждает исследование, в котором были оценены две отдельные подгруппы пациентов с БА: астма с высоким уровнем Th2- и низким уровнем Th2-клеток. Эти подгруппы значительно различались по экспрессии IL-5 и IL-13 в биоптатах бронхов, по гиперчувствительности дыхательных путей, содержанию сывороточного IgE, эозинофилии крови, дыхательных путей, субэпителиальному фиброзу и экспрессии гена муцина в клетках дыхательных путей [43]. Дисбаланс

Th1- и Th2-опосредованных иммунных реакций в сторону преобладания Th2-пути иммунного ответа является ключевым фактором формирования предрасположенности к развитию реакций гиперчувствительности немедленного типа и имеет генетическую основу — атопическую конституцию [44].

В патогенезе развития большинства случаев БА играет роль реакиновый или IgE-опосредованный тип гиперчувствительности, который заключается в преобладании Th2-клеток, секретирующих цитокины IL-4, IL-5, IL-9, IL-13. IL-4 обуславливает переключение на синтез IgE в В-клетках, IL-5, IL-13 участвуют в привлечении эозинофилов и ремоделировании в эпителии и подслизистом слое [45]. IgE фиксируются на тучных клетках, при повторном попадании аллерген связывается с IgE, это приводит к дегрануляции тучных клеток, базофилов, и высвобождению медиаторов аллергического воспаления, таких как гистамин, гепарин, и другие, и тем самым поддерживается воспалительный процесс в слизистой оболочке нижних дыхательных путей [46]. Большая часть больных тяжелой БА относится к Th2-эндотипу и имеет эозинофильное воспаление в слизистой нижних дыхательных путей. Так, по данным отечественных исследователей, у 77% больных тяжелой БА присутствует фенотип атопической БА, ассоциированный с эозинофильным воспалением дыхательных путей. В структуре тяжелой неконтролируемой БА частота эозинофильного фенотипа воспаления высока [47].

Таким образом, Th2 зависимый ответ лежит в основе атопической БА, для которой характерно эозинофильное воспаление. Данный фенотип можно разделить на несколько эндотипов: с повышенным уровнем IL-5, с повышенным уровнем IL-13 и повышенным уровнем IgE.

В формировании не Th2 ответа постулируют два основных механизма: доминирование Th1-зависимого ответа с высоким уровнем IFN- $\gamma$  в мокроте и активация IL-17-обусловленного механизма. У пациентов, механизм заболевания которых связан с Th1-зависимым типом иммунного ответа, Th1-клетки характеризуются продукцией большого количества интерферона- $\gamma$  (INF $\gamma$ ), фактора некроза опухоли (TNF) и IL-1, принимающих участие в реализации

гиперчувствительности замедленного типа, приводящему к повреждению тканей [48].

Важное значение в патогенезе астмы может иметь Th17-опосредованный воспалительный механизм. Лимфоциты Th17 опосредуют нейтрофильное воспаление дыхательных путей. Среди 6 членов семейства интерлейкина-17 цитокин IL-17E усиливает воспаление, воздействуя на продукцию IL-4 и IL-13, а представители семейства IL-17A и IL-17F индуцируют нейтрофильный тип воспаления через IL-6 и IL-8. При тяжелой астме Th17-лимфоциты, секретирующие IL-17A или IL-17F, могут способствовать рекрутированию нейтрофилов в дыхательные пути [49].

По результатам исследований, IL-17 участвует в патогенезе БА за счет прямого эффекта на гладкие мышцы дыхательных путей, формирование субэпителиального фиброза и моделирование дыхательных путей. При БА Th17, синтезирующие IL-17A, оказывают воздействие на продукцию муцина и гиперплазию бокаловидных клеток [50]. В исследованиях зафиксировано повышение содержания Th17 при БА [51]. У пациентов с тяжелой БА, с низким ответом на ГКС отмечается высокий уровень IL-17 в мокроте и биоптате. Накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что aberrantная продукция IL-17 является ключевым фактором, определяющим тяжелые формы астмы [52].

Некоторые данные показывают, что во многих случаях воспаление и гиперреактивность дыхательных путей напрямую не коррелируют. Воспаление, чаще коррелирует с изменениями эластичности тканей, чем с сопротивлением дыхательных путей, что может быть связано с ремоделированием тканей, при котором происходит повреждение эпителиальных клеток, отек, накопление иммунокомпетентных клеток и выделение провоспалительных цитокинов [53].

Важно отметить, что в контексте сложного иммунного ответа, IFN $\gamma$  играет важную роль в гиперреактивности дыхательных путей, в то время как IL-17 способствует привлечению нейтрофилов и поддержанию нейтрофильного воспаления в дыхательных путях. Таким образом, IFN $\gamma$ , но не IL-17, играет

важную роль в опосредовании гиперчувствительности дыхательных путей в модели БА [54].

Некоторые фенотипы можно выделить в клинической практике, что позволяет проводить фенотип-специфическую терапию.

Также существует современный взгляд на формирование иммунологических нарушений. Показано, что на реализацию предрасположенности к аллергическим заболеваниям может влиять недостаточность регуляторных Т-клеток, В-регуляторных клеток (Br1), активация ИЛС-клеток (Innate lymphoid cells - врожденные лимфоидные клетки), костимулирующая молекула PD-1.

### 1.2.3 Участие регуляторных Т-клеток

Функциональность иммунной системы определяется активностью Т-лимфоцитов и спектром секретируемых ими цитокинов. Клетки Th2-типа обычно секретируют ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-13, а Th1- и Th17-типа обычно секретируют IFN- $\gamma$  и ИЛ-17, соответственно. Продуцируемые Т-клетками, ИЛ-4, ИЛ-13 необходимы для выработки IgE - ключевого участника аллергических реакций, ИЛ-5 участвует в привлечении эозинофилов.

Регуляторные Т-клетки (Treg) представляют собой субпопуляцию Т-хелперных клеток, активно подавляющих другие иммунные клетки, особенно Th1, Th2 и Th17 типов.

В формировании предрасположенности к аллергическим заболеваниям участвует как количественный дефицит, так и снижение функции Treg. Гетерогенная группа Treg обеспечивает иммунологическую толерантность, в том числе в респираторном тракте. Выделяют натуральные (nTreg, natural) тимусного происхождения и индуцибельные (iTreg, induced) Treg, возникающие на периферии из обычных Т-клеток под влиянием TGF- $\beta$  и, возможно, ретиноевой кислоты. Натуральные регуляторные Т-клетки с фенотипом CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> составляют 1–5% периферических CD4<sup>+</sup> Т-клеток. Они обладают супрессорной активностью в отношении аутоиммунных Т-лимфоцитов и предупреждают образование Т-эффекторных лимфоцитов [55]. Антиген-специфические

(индуцибельные) iTreg образуются в периферических тканях в результате иммунизации аллергеном или длительного нахождения аллергена в окружающей среде. Эти клетки способны вырабатывать IL-10 и TGF- $\beta$ , которые ингибируют Th2 ответ.

Были охарактеризованы три основных подгруппы iTreg: экспрессирующие FoxP3 iTreg; Tr1, продуцирующие IL-10; и клетки Th3, экспрессирующие TGF- $\beta$ . Неоднократно было показано, что все три подмножества iTreg сосуществуют и перекрываются во многих связанных с иммунной толерантностью ситуациях [56].

Tr1 важны для поддержания адекватного иммунного ответа для профилактики различных заболеваний, таких как аллергия, аутоиммунные состояния, обеспечение толерантности к трансплантату, снижение выраженности реакции «трансплантат против хозяина». Хотя IL-10 является основным цитокином, продуцируемым Tr1, эти клетки также продуцируют TGF- $\beta$  и низкие или средние уровни IFN- $\gamma$  и IL-5. Tr1 человека подавляют ответы эффекторных T-клеток с помощью множества механизмов, которые зависят от IL-10, TGF- $\beta$ , PD-1, CTLA-4 и гистаминового рецептора 2 (H2R). IL-10 обладает мощной иммуносупрессивной способностью, которая имеет решающее значение не только для установления периферической толерантности к аллергенам, но и для защиты хозяина от чрезмерных воспалительных реакций на патогены, а также для снижения рисков реализации аутоиммунных заболеваний. Помимо регуляции T-клеток, IL-10, секретлируемый Tr1, играет важную роль в индукции IgG4 и подавлении IgE [57].

Показано, что введение антиген-специфических CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> регуляторных T-клеток, экспрессирующих IL-10, снижало острую аллергическую воспалительную реакцию, гиперреактивность и ремоделирование бронхов. Проводилось исследование, в котором при БА, вызванной сенсibilизацией аллергеном таракана, оба типа регуляторных клеток nTreg и iTreg, введенных внутривенно, вызвали обратное развитие заболевания. Эффект iTreg зависел от высокого уровня TGF- $\beta$ , IL10 [58]. Исследование Treg, выделенных из бронхоальвеолярного лаважа у детей, больных БА, продемонстрировало

способность Treg ингибировать пролиферацию Т-лимфоцитов и снижать синтез Th2 цитокинов [173].

Нарушение баланса между Treg и эффекторными Т-клетками приводит к развитию патологий. Так, элиминация или инактивация CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Treg вызывает аутоиммунные заболевания, а также усиливает иммунный ответ на аллоантигены и опухолевые клетки [59]. Количественное содержание в крови клеток, экспрессирующих FoxP3, прямо пропорционально коррелирует с супрессорной активностью Treg и обратно пропорционально с уровнем IgE [60].

Иммунная супрессия, опосредованная регуляторными Т-клетками, направлена на разные типы иммунокомпетентных клеток. Мишенями для супрессии Treg могут стать CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, В-клетки, дендритные клетки, макрофаги, тучные клетки, NK- и NKT-клетки [6]. Широкий спектр супрессорных механизмов, используемых Treg, делится на две основные группы по действию на клеточные мишени: способы супрессии, направленные на Т-клетки (супрессорные цитокины, создание дефицита IL-2 за счет его потребления Treg, цитолиз), и способы супрессии, направленные на антигенпрезентирующие клетки (снижение костимуляторных молекул или снижение антигенной презентации) [7]. Также существует другая классификация механизмов супрессии, когда они подразделяются по способу действия. Это клеточно-контактная супрессия при участии в межклеточном взаимодействии PD-1/PD-L1, OX40/OX40L, CTLA-4/B7, LAG3, TGF-β, цАМФ или гранзимов. Супрессия через изменение метаболизма клеток-мишеней, в частности через рецептор CD39 (ENTPD1 – эктонуклеозидтрифосфатдифосфогидралаза 1), который подавляет воспаление и экспрессируется на поверхности активированных Т-лимфоцитов, регуляторных Т-клетках. А также супрессия, опосредованная локальной секрецией цитокинов с ингибиторными свойствами (TGF-β, IL-10, IL-35), а также супрессия АПК (CD80 и CD86/CTLA-4) и конкурентное связывание факторов роста [61, 62].

Одним из механизмов опосредованной Treg иммунной супрессии является конкуренция за фактор роста - IL-2, который необходим для нормального функционирования Т-лимфоцитов. К тому же IL-2 требуется для поддержания

субпопуляции nTreg на периферии и индукции iTreg [63], что может приводить к дефициту IL-2 для эффекторных Т-клеток.

Регуляторная функция CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/high Т-лимфоцитов осуществляется посредством цитотоксического эффекта на клетку-мишень при помощи перфорина, гранзима В и CD18 без участия Fas-рецептора. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/high Т-лимфоциты могут также оказывать супрессорный эффект через экспрессию TGF-β. Эффекты Th3 и iTreg связаны с продукцией TGF-β, IL-4 и IL-10, они приводят к угнетению продукции иммуноглобулинов плазмочитами и модулируют антигенпрезентирующую активность макрофагов и дендритных клеток [64].

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о положительной ассоциации уровня и функциональной активности регуляторных Т-клеток с клиническим эффектом на фоне медикаментозной терапии (глюкокортикоиды и β-2-агонисты пролонгированного действия) [65] и аллерген-специфической иммунотерапии [66].

Причины недостаточной функциональности регуляторных Т-клеток у больных с аллергией в настоящее время остаются мало изученными и требуют дополнительных исследований. Опубликована работа, в которой оценивали роль дефекта костимулирующей молекулы CD46 в патогенезе астмы. CD46 является костимулирующей молекулой, необходимой для образования Th1 из CD4<sup>+</sup> клеток. В этом исследовании был выявлен функциональный дефект CD46 у больных бронхиальной астмой, который был связан с нарушением трансформации CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клеток в регуляторные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоциты, продуцирующие IL-10 [67].

Регуляторные клетки подавляют симптомы аллергических заболеваний за счет снижения активности аллерген-специфических эффекторных клеток, подавления продукции IgE и повышения уровня IgG4 и IgA [59, 68–70].

В настоящее время ведется активный поиск способов воздействия на регуляторные Т-клетки с целью их использования в иммунотерапии. Изучение клеточных и молекулярных основ развития и функционирования Treg поможет созданию принципиально новых подходов в практической иммунологии.

Иммунотерапия – это лечение, при котором предполагается активировать Treg, и новые фармацевтические стратегии нацелены усилить противовоспалительные механизмы, чтобы восстановить иммунную толерантность при минимальном воздействии на иммунные реакции, не связанные с аллергическим ответом [71].

Дисбаланс Th1- и Th2-опосредованных иммунных реакций в сторону преобладания Th2-пути иммунного ответа является ключевым фактором формирования предрасположенности к развитию реакций гиперчувствительности немедленного типа, в результате избыточной выработки IgE [72]. Однако средовые факторы играют также немаловажную роль в реализации фенотипических проявлений предрасположенности к атопии [73, 74].

Теоретически регуляторные Т-клетки могут препятствовать развитию аллергических заболеваний на различных этапах патогенеза, включая сенсibilизацию, прогрессию, ремоделирование и гиперреактивность дыхательных путей, персистенцию аллергического воспаления. Согласно публикации Eleanor M. Ling et al., CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клетки у лиц с сенсibilизацией к пыльце трав отличались пониженной способностью супрессировать пролиферацию CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Т-клеток и продукцию ими IL-5 [75].

Исследователями была выделена подгруппа пациентов с аллергическими заболеваниями с высоким уровнем IL-4 и нарушенной регуляцией IL-10 [76]. У пациентов, страдающих аллергией, было нарушено подавление чрезмерной активации Th2 иммунного ответа, поскольку как CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клетки, так и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Т-клетки продуцировали IL-5 и IL-13 в ответ на стимуляцию аллергеном [77].

Выявлено, что больные аллергической астмой характеризовались выраженным снижением способности индуцировать толерогенные дендритные клетки *in vitro*; нарушенная функция была ассоциирована с пониженной экспрессией IL-10 и тяжестью заболевания [78].

Опубликованы данные о недостаточной функциональной активности CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-клеток у взрослых и у детей, больных бронхиальной астмой, при стимуляции регуляторных Т-клеток аллергенами *in vitro* [79, 80].

При атопии Tr1 способны ингибировать трансформацию Т-клеток в направлении Th2, секретирующих IL-4. Согласно мнению ряда авторов, IL-10, ключевой цитокин, экспрессируемый Tr1, является иммуносупрессорным цитокином, подавляющим как Th1-, так и Th2-зависимый иммунный ответ [81, 82]. Дефицит или снижение функции регуляторных Т-клеток может приводить к активации В-лимфоцитов, которые являются важными участниками аллергических заболеваний.

#### 1.2.4 Субпопуляции В-клеток

Выделяют две субпопуляции В-клеток: В1 и В2. В1 – это относительно небольшая группа В-клеток, которая составляет около 5 % от общей популяции В-лимфоцитов, отличительным маркером этих клеток является молекула CD5. На своей поверхности они экспрессируют IgM, выполняющие в большей степени антибактериальную функцию. Место локализации В1-лимфоцитов - серозные полости, так как они предназначены для быстрой реакции на инфекционные микроорганизмы [83].

Субпопуляцию В2 составляют обычные В-лимфоциты. В-клетки способны интернализировать свои мембранные иммуноглобулины вместе со связанным с ними антигеном и затем презентировать фрагменты антигена в комплексе с молекулами МНС класса II. При низкой концентрации антигена и при вторичном иммунном ответе В-клетки могут выполнять функцию основных антигенпрезентирующих клеток [84].

Более того, недавно было продемонстрировано, что IL-10-секретирующие В регуляторные (Br1) клетки вносят существенный вклад в толерантность к аллергенам. Br1, показали повышенную экспрессию IL-10 с антиген-специфической супрессорной способностью. Главный вывод этого исследования заключался в том, что продукция IgG4 специфически ограничивается Br1 [85].

Показано, что клетки CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Breg играют защитную роль при развитии пищевой аллергии, не опосредованной IgE, а именно в поддержании толерантности к молоку. В дополнение к этому сообщалось, что Breg, экспрессирующие IL-10 и IL-32, играют решающую роль в поддержании иммунной толерантности при пищевой аллергии, не связанной с IgE. При стимуляции казеином фракция клеток CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Breg значительно уменьшилась в группе с аллергией на молоко и увеличилась в группе толерантных к молоку. Параллельно было обнаружено, что стимуляция аллергеном связана с увеличением числа Treg (как в группе с аллергией на молоко, так и в группе, переносящей молоко). Это говорит о том, что клетки CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>Breg играют важную роль в поддержании толерантности к аллергенам [86, 87].

CD23 - низкоаффинный рецептор IgE, играет важную роль в контроле активности аллерген-специфических Т-клеток посредством презентации аллергена В-клетками при участии IgE. Поверхностная плотность CD23 на В-клетках пациентов с аллергией коррелирует с уровнями аллерген-специфического IgE и определяет связывание аллергена В-лимфоцитами и последующую активацию Т-клеток [88].

### 1.2.5 Врожденные лимфоидные клетки (ILC)

Очень важным достижением стало открытие врожденных лимфоидных клеток (ILC – innate lymphoid cells) как ключевых участников патогенеза бронхиальной астмы. Врожденные лимфоидные клетки не экспрессируют антигенные рецепторы, но быстро реагируют на «сигналы опасности» от воспаленной ткани и производят набор цитокинов, которые направляют последующий иммунный ответ. Роли ILC могут различаться при разных фенотипах астмы [89].

В организме врожденные лимфоидные клетки рассредоточены преимущественно в барьерных тканях, на границе внешней и внутренней среды (например, в слизистых). Врожденные лимфоидные клетки в достаточном количестве обнаруживаются и в слизистых дыхательных путей [90].

Врожденные лимфоидные клетки классифицируются по аналогии с Т-клетками на три типа в зависимости от профиля продуцируемых цитокинов: ILC1 соответствуют Th1, ILC2 - Th2, ILC3 - Th17. У ILC2-типа нет аллерген-распознающих рецепторов, они продуцируют IL-5, IL-13 в ответ на сигналы со стороны эпителиальных клеток (IL-25, IL-33) при стимуляции различными неспецифическими триггерами, повреждающими дыхательный эпителий. Врожденные лимфоидные клетки 2 типа могут иметь важное значение для запуска адаптивных иммунных ответов при реактивном типе гиперчувствительности, опосредуемом ингаляционными аллергенами. Существуют данные, что астма, вызванная ожирением, связана с экспансией в легких ILC3, продуцирующих IL-17A. Точная роль ILC при различных типах астмы еще не установлена, данный вопрос активно исследуется в настоящее время [91].

Врожденные лимфоидные клетки предотвращают бактериальную транслокацию за пределы эпителиального барьера, индуцируют продукцию IgA в слизистых оболочках и действуют как регуляторы активности иммунной системы. Доказано, что комменсальные бактерии вызывают пролиферацию ILC [92].

Врожденные лимфоидные клетки презентуют Т-лимфоцитам пептидные фрагменты антигенов бактериального происхождения в комплексе с молекулами МНС II класса. Но по причине того, что на мембране ILC-клеток нет ко-стимулирующих молекул, эта презентация носит толерогенный, а не активирующий характер [93]. Изменение иммунного ответа под влиянием микробиоты может иметь механизм, опосредованный через регуляторные Т-клетки, рецепторы врожденного иммунитета (TLR). Кишечные бактерии могут модулировать иммунный ответ, непосредственно воздействуя на Treg через TLR [94].

У человека отдельные группы ILC (показано для ILC3) могут находиться в неактивном состоянии во вторичных лимфоидных органах, но при активации могут участвовать в реализации воспалительных реакций за счет продукции цитокинов IL-17 и IL-22. Анализ транскрибируемых генов в ILC1, ILC2, ILC3 и NK-клетках не выявил уникальных генов, регулирующих развитие конкретной

популяции, что указывает на пластичность отдельных стадий дифференцировки и возможность взаимных переходов ILC. Несмотря на то, что дифференцировка ILC происходит под влиянием цитокинового микроокружения, сами ILC также воздействуют на окружающие клетки и ткани посредством цитокинов [95]. Врожденные лимфоидные клетки способствуют дифференцировке плазматических клеток в пейеровых железах и переключению синтезируемых антител на IgA. Описано, что ILC2 под влиянием IL-25 и IL-33, секретируемых эпителиальными клетками кишечника при гельминтозах, увеличивают секрецию IL-5, который стимулирует пролиферацию эозинофилов. Также ILC2 поддерживают активацию Th2-лимфоцитов и стимулируют, таким образом, адаптивный иммунный ответ [95, 96]. Таким образом, формирование различных групп ILC осуществляется под контролем клеток микроокружения. При этом ILC могут воздействовать как на другие клетки врожденного иммунитета, так и регулировать реакции адаптивного иммунного ответа [97].

#### 1.2.6 Роль PD-1 (programmed death-1) и его лигандов

Ингибирующая молекула PD-1 (programmed death-1) участвует в регуляции Т-клеточной активации, толерантности, противоопухолевом иммунном ответе, в развитии аутоиммунной или аллергической патологии. Было установлено влияние лигандов молекулы PD-1 - PD-L1 (programmed death-ligand 1) и PD-L2 (programmed death-ligand 2) на развитие аллергических реакций дыхательных путей при БА [98].

Существуют данные, что PD-L1 и PD-L2 обладают оппозитной ролью в развитии гиперреактивности и воспалении бронхов в модели на животных [99]. У мышей, дефицитных по PD-L1, наблюдалось уменьшение уровня гиперреактивности и воспаления бронхов относительно мышей дикого типа. А при дефиците PD-L2 у мышей, напротив, усиливалась гиперреактивность бронхов по сравнению с диким типом мышей. При межклеточном взаимодействии костимулирующей молекулы PD-1 с лигандом PD-L1 на дендритных клетках легких происходит индукция Th2 ответа, образуются эффекторные Th2-клетки,

продуцирующие IL-4, что, в итоге, приводит к повышению гиперреактивности дыхательных путей. При связывании PD-1 с лигандом PD-L2 инициируется Th1 ответ, усиливается продукция INF $\gamma$  Th1-клетками, что способствует снижению гиперреактивности бронхов. Синхронная экспрессия PD-L1 и PD-L2 лигандов нейтрализует поляризацию эффектов и приводит к балансу между Th1 и Th2 ответом [99].

### 1.3 Фармакотерапия БА. Основные принципы лечения

Основным принципом лечения БА является применение ступенчатого подхода, в основе которого, лежит постепенное увеличение объема терапии до достижения необходимого уровня контроля заболевания с последующим снижением до минимально поддерживающего уровня. Фармакотерапия БА может быть разделена на два ключевых воздействия — расширение бронхов посредством снижения тонуса гладких мышц и улучшение бронхиальной проходимости за счет снижения воспаления стенки дыхательных путей. Лечение БА в соответствии со ступенчатым принципом включает 5 ступеней, которые подразумевают использование быстродействующих  $\beta_2$ -агонистов, ИГКС, комбинации ИГКС с длительно действующими  $\beta_2$ -агонистами [8].

#### Основные группы бронхорасширяющих препаратов.

Бронхорасширяющие препараты разделяют по длительности действия и скорости наступления эффекта.  $\beta_2$ -адреномиметики могут оказывать кратковременное действие (сальбутамол, фенотерол, 4—6 ч), либо длительное действие (салметерол, формотерол — до 12 ч) и быстрое наступление эффекта (сальбутамол, фенотерол, формотерол), или медленное (салметерол).

$\beta$ -адренорецепторы экспрессируются многими клетками и широко распределены в респираторном тракте.  $\beta_2$ -агонисты расширяют периферические (мелкие) бронхи и проксимальные воздухоносные пути [100]. Однако действие этих препаратов ограничено по времени, КДБА быстро и эффективно устраняют симптомы БА, но они не могут воздействовать на воспаление дыхательных путей и не предупреждают развитие у больного обострений в дальнейшем [101].

Наиболее распространенные побочные эффекты КДБА: тахикардия, тремор, головная боль.

Антихолинергические препараты также могут оказывать ограниченное по времени влияние (ипратропия бромид — 4–6 ч) и длительное действие (тиотропия бромид — до 24 ч). В серии клинических исследований было показано, что тиотропий обладает не только бронхорасширяющим, но и противовоспалительным и бронхопротективным эффектом [102]. Нежелательные эффекты встречаются примерно у 3% больных, получающих АХП. Больные могут отмечать сухость и горечь во рту, боль в горле или в груди, кашель и очень редко - аллергические реакции и тахикардию (при введении больших доз) [103].

Препараты, направленные на снижение воспаления стенки дыхательных путей.

Ингаляционные глюкокортикостероиды (ИГКС) представлены в практической медицине препаратами Беклометазон, Будесонид, Мометазон, Флутиказон.

Молекула ГКС проникает в клетки, увеличивает доступность ДНК для РНК-полимеразы II, которая обеспечивает синтез мРНК и образование белков, обладающих противовоспалительным эффектом, этот геномный эффект ГКС называется трансактивацией. Однако известен и внегеномный эффект ГКС, заключающийся в торможении транскрипции генов, кодирующих синтез провоспалительных белков (IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, ФНО, М-КСФ, фосфолипазы A<sub>2</sub>, молекул адгезии и т. п.). Этот процесс называется трансрепрессией [104].

Ингаляционные ГКС способны обеспечивать контроль над симптомами и снижение потенциальных рисков (включая риск летальных исходов) у больных с любой степенью тяжести БА [105]. Местные нежелательные эффекты: орофарингеальный кандидоз, дисфония, фарингит, рефлексорный кашель и парадоксальный бронхоспазм. Системные нежелательные эффекты возможны в результате длительного лечения высокими дозами ИГКС и включают: угнетение коры надпочечников, снижение минеральной плотности костной ткани,

замедление линейного роста у детей, изменение массы тела, развитие катаракты и глаукомы, истончение кожи и склонность к образованию синяков [106].

Синергизм  $\beta_2$ -агонистов и ИГКС складывается из противовоспалительного эффекта, который достигается вдвое меньшими дозами ИГКС, а присутствие ИГКС обеспечивает высокую плотность  $\beta$ -рецепторов на мембране клеток-мишеней. Добавление ингаляционных ДДБА к регулярной терапии ИГКС позволяет достичь контроля над БА у большего числа пациентов, быстрее и при меньшей дозе ИГКС по сравнению с монотерапией ИГКС [107].

Препараты для системной терапии.

Системные глюкокортикостероиды (СГКС) остаются важным компонентом в лечении БА тяжелого течения, особенно в периоды тяжелых обострений. Курс СКС обычно составляет 5—14 дней с отменой без ступенчатого снижения (или с постепенным снижением) и переходом на высокие дозы ингаляционных глюкокортикостероидов (ИГКС) в сочетании с  $\beta_2$ -адреномиметиком длительного действия [108].

Антилейкотриеновые препараты (АЛТР) — приняты в качестве альтернативной базисной терапии. Выделяют 2 группы препаратов: антагонисты рецептора цистеиниловых лейкотриенов: Монтелукаст, Пранлукаст, Зафирлукаст и ингибитор 5-липоксигеназы — Зилеутон. Противовоспалительная активность антилейкотриеновых препаратов уступает ИГКС, однако их совместное применение с ИГКС позволяет снизить гормональную нагрузку. Антилейкотриеновые препараты включены в пошаговую терапию руководства GINA (2021), отмечено, что они эффективны при аспириновой астме и астме физического усилия. Механизм действия препаратов данной группы заключается в быстром устранении базального тонуса дыхательных путей, который поддерживается лейкотриенами вследствие хронической активации 5-липоксигеназной ферментной системы. Действие АЛТР не дублирует противовоспалительные эффекты ИГКС, а реализуется через подавление совсем других механизмов развития воспаления [109]. У пациентов, принимавших АЛТР,

были описаны психоневрологические нарушения: ажитация, агрессивное поведение, враждебность, нарушение сна.

Генно-инженерные биологические препараты (ГИБП).

Большим достижением в терапии БА являлось получение моноклональных антител (МАТ), обладающих способностью специфично связывать соответствующие им антигены с высокой селективностью [110]. Моноклональные антитела производятся В-лимфоцитами, которые являются клонами одной родительской клетки и специфичны к единственному эпитопу антигена [111].

Целью терапии, основанной на использовании моноклональных антител, является выведение из организма или нейтрализация специфической мишени, связанной с заболеванием. Терапевтические антитела могут выполнять три принципиальные задачи: блокировка действия определенной молекулы, связывание с определёнными клетками, выполнение функции сигнальной молекулы. Блокирующая активность терапевтических антител достигается предотвращением связывания факторов роста, цитокинов и их растворимых медиаторов с их рецепторами. Эта цель достигается путем связывания моноклонального антитела с ними или с соответствующими рецепторами [110].

Антитела против IgE–Омализумаб– рекомбинантное гуманизированное моноклональное антитело, связывающее свободный IgE и препятствующее его взаимодействию с рецепторами тучных клеток, базофилов и других участников аллергического воспаления I-го типа, способствует уменьшению применения препаратов неотложной терапии, повышению качества жизни пациентов, снижает риск развития обострений и госпитализаций [112]. Вместе с тем существует несколько не до конца понятных вопросов, в частности «ребаунд-эффект», после прекращения терапии сывороточный уровень IgE вернулся у большинства пациентов к базальному уровню через 18-20 недель после последней инъекции препарата, причем это изменение коррелировало с возвращением и симптомов БА [112].

В связи с тем, что цитокины выступают в роли важнейших медиаторов развития аллергического воспаления, осуществляется поиск методов терапевтического воздействия на баланс эндогенных цитокинов.

В настоящее время разработаны три молекулы моноклональных антител против IL-5. Две из них - меполизумаб и реслизумаб - взаимодействуют со свободным IL-5, одна - бенрализумаб - с  $\alpha$ -цепью высокоаффинного рецептора для IL-5. Меполизумаб блокирует эффект IL-5, тем самым нейтрализует эозинофильное воспаление и нормализует количество эозинофилов в крови и мокроте. Показан в качестве дополнительной поддерживающей терапии тяжелой эозинофильной астмы. В проведенных многоцентровых исследованиях показано, что терапия меполизумабом позволяет добиться увеличения ОФВ<sub>1</sub> на 98–100 мл, уменьшения числа обострений на 47-53%, улучшения показателей опросников SGRQ и ACQ5, при этом профиль безопасности не отличался от плацебо [113, 114, 115]. Но прекращение лечения приводило к возврату прежнего уровня эозинофилии в мокроте и крови, что коррелировало с возвратом клинических симптомов БА, наблюдаемых в течение 3-6мес после отмены препарата [34]. Реслизумаб – препарат, разработанный для лечения пациентов с неконтролируемой БА эозинофильного фенотипа. Используется в качестве поддерживающей терапии для предотвращения обострений, облегчения симптомов и улучшения функции легких у пациентов, страдающих БА с повышенным числом эозинофилов в периферической крови и отсутствием адекватного контроля [116]. В клинических исследованиях показано, что в результате терапии реслизумабом достигнуто увеличение ОФВ<sub>1</sub>, уменьшение количества обострений, сокращение баллов ACQ7 [117]. Наиболее частыми нежелательными явлениями были явления связанные с ухудшением течения БА и аллергического ринита, назофарингиты, синуситы и инфекции верхних дыхательных путей, головная боль, бронхиты и инфекции мочевыводящих путей. В клинических исследованиях у трех пациентов (0,3%), зарегистрирована анафилактическая реакция, которая разрешилась после оказанного на месте соответствующего лечения [116]. При лечении бенрализумабом - показан прирост

ОФВ<sub>1</sub>, уменьшение частоты обострений, при этом нежелательные явления существенно не отличались от плацебо при лечении больных тяжелой БА [119, 120]. Дупилумаб - моноклональное антитело против рецептора к ИЛ-4. Данный препарат ингибирует передачу сигналов как к ИЛ-4, так и к ИЛ-13 и применяется в терапии тяжелой БА [121].

Назначение иммунобиологических препаратов осуществляется пациентам с анамнезом 6 месяцев и более лечения тяжелой БА, получающим терапию БА в объеме, который соответствует 5-й ступени по GINA (2021г.); больным, имеющим на фоне проводимой терапии, неконтролируемое течение заболевания, или утрачивающим контроль над астмой при попытке снижения доз противовоспалительных и бронхолитических средств [122].

Аллергенспецифическая иммунотерапия (АСИТ).

Аллергенспецифическая иммунотерапия (АСИТ или специфическая иммунотерапия, СИТ) — введение в организм пациента возрастающих доз того аллергена, к которому у больного выявлена повышенная чувствительность и который отвечает за клинические проявления заболевания (метод известен с 1911 г.). Механизм действия АСИТ заключается в продукции блокирующих IgG, и далее не происходит дегрануляции тучных клеток с последующим высвобождением медиаторов аллергического воспаления. Отечественные эксперты отмечают, что АСИТ высокоэффективна при аллергических сезонных и круглогодичных ринитах (риноконъюнктивитах) и при атопической БА. В GINA (2021г.) отмечено, что АСИТ играет ограниченную роль в лечении взрослых пациентов с БА. Для адекватной иммунотерапии необходимо выявление и использование клинически значимого аллергена. Значимость АСИТ возрастает у таких пациентов, у которых тщательная элиминация аллергенов и фармакологическое лечение, включающее ИГКС, не позволили достигнуть контроля над БА [123].

Общепризнанными ограничениями АСИТ является отсутствие коммуникации и/или сотрудничества (возраст до 5 лет, психические заболевания), беременность до начала АСИТ, лечение β-блокаторами, старшие возрастные

группы, неконтролируемая астма, иммунные заболевания и злокачественные новообразования, предшествующая анафилаксия, преходящие ситуации (острые лихорадочные заболевания, воспалительные и инфекционные заболевания, обострение бронхиальной астмы). Воспаление желудочно-кишечного тракта, удаление зубов или операции на ротовой полости и инфекции были обозначены как временные противопоказания для сублингвальной АСИТ [124].

Данные, полученные на экспериментальных моделях у животных, послужили основой для создания в настоящее время новых подходов к иммунотерапии аллергических заболеваний, основанных на индукции аллерген-специфической и неспецифической иммуносупрессии, опосредованной регуляторными Т-клетками [118, 125].

Все больше внимания уделяется иммунотерапии с применением клеточных технологий. Данные методы имеют ряд существенных преимуществ. Так, терапия моноклональными антителами, алерговакцинами требует длительного, многокурсового их использования, что приводит к побочным эффектам. При применении методов клеточной иммунотерапии побочных эффектов не возникает, так как все воздействия на них МАТ, цитокинов осуществляется вне организма.

#### 1.4 Иммунотерапия

Клеточная иммунотерапия включает дендритные клетки и макрофаги, Т- и В-лимфоциты, НК-клетки и мезенхимальные стволовые клетки. К настоящему времени наибольшее распространение получила терапия заболеваний дендритными клетками [126]. Активно внедряются в клиническую практику мезенхимальные стволовые клетки в качестве клеток-супрессоров для лечения аутоиммунных заболеваний и профилактики реакции «трансплантат против хозяина» [127,128].

Для стимуляции регенеративных процессов при различного рода повреждениях органов и тканей применяются субпопуляции макрофагов 2-го типа (M2) [129,130].

Для подавления активности аутоагрессивных Т-лимфоцитов при аутоиммунных заболеваниях, а также при аллергических применяются регуляторные Т-клетки [131,132].

Применяются и клетки с направленностью против идиотипов Т-клеточных рецепторов и клеточных эрготовов аутоагрессивных Т-клеток [133-136].

Однако, несмотря на положительные эффекты проводимой иммунотерапии отдельными препаратами, о полном выздоровлении больных с ревматоидным артритом, бронхиальной астмой, раком прямой кишки и другими говорить не приходится. Иммунопатогенез этих заболеваний является многокомпонентным, с нарушением нормального функционирования различных звеньев иммунной системы. Следовательно, иммунотерапия должна быть комплексной.

Накоплен огромный фактический материал о ведущей роли нарушений функций иммунной системы в патогенезе основных заболеваний человека. Эти изменения главным образом касаются популяции клеток с супрессорной активностью. Ведущее место в лечении больных с этой патологией должна занимать иммунотерапия, эффективность которой в ряде случаев можно считать доказанной [137].

Применение иммунотерапии с помощью активированных аутологичных лимфоцитов при различных заболеваниях.

Показаны результаты использования иммунной терапии антиген-реактивными клетками при рассеянном склерозе [10]. Проводилось исследование, в котором пациенты с прогрессирующей формой рассеянного склероза были многократно иммунизированы аутологичными активированными Т-лимфоцитами. У 41 % пациентов признаков прогрессии заболевания отмечено не было, у 13 % было зарегистрировано неврологическое улучшение. Из контрольных пациентов, не получавших лечения, ни одного случая неврологического улучшения не было зарегистрировано. У пациентов с рассеянным склерозом после проведенной иммунотерапии наблюдались снижение уровня IFN $\gamma$  и подъем уровня IL-4 и IL-10 в сыворотке крови, тогда как содержание IL-17 и IL-18 оставались на исходных значениях. Также, у пациентов, получивших иммунотерапию, регистрировалось

значительное снижение пролиферативного ответа мононуклеарных клеток периферической крови на миелиновый антиген [138].

Опубликованы результаты клинических испытаний вакцины, содержащей пептид HSP60, в лечении сахарного диабета I типа [139]. В целом хорошие результаты получены в ходе применения Treg для иммунотерапии при сахарном диабете 1-го типа (СД1). Клинические испытания стартовали в 2014 г. с рандомизированного исследования фазы I с целью оценки безопасности и целесообразности инфузии аутологичных Treg, полученных *ex vivo* у пациентов в возрасте 7–18 лет с недавно диагностированным СД1. По результатам годового исследования не было выявлено сильных побочных эффектов и тем самым подтверждена безопасность лечения. Кроме того, у 8 из 12 пациентов были выявлены признаки клинической ремиссии.

Результаты терапии активированными аутологичными T-лимфоцитами больных атопическим дерматитом показали безопасность и высокую клиническую эффективность такого подхода в лечении пациентов, как с аллергической, так и с неаллергической формой заболевания. Воздействие на клеточное звено иммунной системы, при разных формах заболевания также различалось. При аллергической, форме наблюдалось повышение числа CD8<sup>+</sup>T-клеток, при неаллергической — CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-клеток и изменения гиперчувствительности замедленного типа [15].

#### 1.4.1 Антиэрготипический ответ

Идиотип-антиидиотипические (ИАИ) взаимодействия, существование которых впервые предположил Н. Эрне, — специфические взаимодействия между антигенраспознающими молекулами и несущими их лимфоцитами на основе узнавания детерминант (идиотипов), локализованных в гипервариабельной области V-доменов иммуноглобулинов или T-клеточных рецепторов [140]. Теория Эрне получила многочисленные экспериментальные доказательства. Показана важная роль ИАИ взаимодействий в саморегуляции иммунного ответа, поддержании иммунной памяти [141], селекции репертуара лимфоцитов и установлении разнообразия, а также естественной иммунной активности,

независимой от внешней антигенной нагрузки [142]. Повышение активности антиидиотипических лимфоцитов, специфичных к идиотипам аутоклонов, может подавлять аутоиммунные реакции, приводить к ремиссии аутоиммунных заболеваний [143]. При изучении антиидиотипического ответа в модели Т-клеточной иммунотерапии были показаны проявления еще одного типа регуляции, направленного против детерминант Т-клеток, активированных антигеном (эрготопов) – антиэрготипического ответа. Было установлено, что иммунотерапия активированными Т-клетками, независимо от их антигенной специфичности, может защищать от активации иммунного процесса. Детерминанты, вызывающие данный ответ (эрготопы), включают молекулы, экспрессируемые активированными Т-клетками (CD25, HSP60, HLA), а клетки, отвечающие на детерминанты активированных клеток — антиэрготипические клетки [9,10]. Антиэрготипический ответ — это ответ, в индуктивной фазе которого антиэрготипические клетки отвечают на активированные антигеном Т-клетки, а формирующиеся клетки-эффекторы – на активированные Т-клетки, независимо от их антигенной специфичности. Набор детерминант активированных Т-клеток включает все необходимые молекулы для запуска иммунного ответа на антиген: MHC I и II класса, CD80 и CD86, молекулы адгезии. Активированные Т-клетки вызывают иммунный ответ при вакцинации и запускают активацию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток. Молекула CD25 экспрессируется только на активированных Т-клетках, это относительно ранний маркер, HLA-DR - маркер поздней активации [11].

#### 1.4.2 Участие антиидиотипического и антиэрготипического ответа в аллергических и аутоиммунных патологиях

В результате иммунизации активированными Т-лимфоцитами генерируется два типа клеток: одни распознают идиотип, ассоциированный с Т-клеточным рецептором, другие, антиэрготипические, распознают активационные маркеры и супрессируют Т-клетки путем, не связанным со специфическим распознаванием.

Эти данные позволяют предполагать изменения активности регуляторных клеток в результате индукции антиэрготипического ответа, что дает возможность

корректировать дисбаланс с преобладанием Th2-клеток, характерный для атопических заболеваний, и уменьшить клинические проявления аллергии [10].

Клетками-эффекторами антиэрготипического ответа могут быть как ГЗТ-эффекторы, так и цитотоксические Т-клетки [144]. Эффекты антиэрготипического ответа аналогичны эффекторным функциям клеточного приобретенного ответа: цитотоксичность ГЗТ. Введение активированных Т-лимфоцитов способствуют активации собственных регуляторных Т-клеток. Treg могут подавлять активность других типов клеток экспрессией негативных костимуляторных молекул, индукцией противовоспалительных реакций эффекторных Т-клеток и APC, их лизисом, потреблением факторов роста или продукцией иммунорегуляторных цитокинов [66].

В экспериментальных работах показано снижение антиэрготипического ответа при развитии аутоиммунной и аллергической патологии и возможность его стимуляции [13].

Эти данные указывают на значительный иммунорегуляторный потенциал иммунной терапии, которая в перспективе может найти широкое применение в лечении аутоиммунных и аллергических заболеваний. Использование Т-клеточной иммунотерапии возможно в лечении пациентов с бронхиальной астмой.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Дизайн исследования и критерии включения и исключения*

Диссертационная работа основана на результатах клинико-иммунологического обследования больных бронхиальной астмой, находившихся на стационарном или амбулаторном лечении в аллергологическом отделении НИИФКИ в период с сентября 2012 по июнь 2018 года. Исследования выполнены в рамках поисковых научно-исследовательских работ лаборатории клеточной иммунопатологии НИИФКИ. Протокол исследования № 67 от «20» января 2012 года был одобрен на заседании локального этического комитета.

В нерандомизированное пилотное исследование было включено 43 человека, из них 30 пациентов с бронхиальной астмой в возрасте от 23 до 61 лет, средний возраст  $39 \pm 4,3$  года и 13 условно здоровых доноров, от 24 до 42 лет, средний возраст  $28 \pm 7,03$  года. Все пациенты с БА на момент забора материала находились на лечении или наблюдались амбулаторно в Клинике иммунопатологии НИИФКИ г. Новосибирска. Забор материала у пациентов и условно-здоровых доноров производился с их предварительного информированного письменного согласия. Пациенты включались в исследование в соответствии с критериями включения и исключения:

#### Критерии включения:

- Мужчины и женщины в возрасте от 18 до 65 лет включительно
- Диагноз астмы верифицирован не менее, чем за 12 месяцев до включения пациента в исследование согласно критериям NIH, 2007.
- Пациенты должны принимать базисную терапию ИГКС не менее 12 недель до включения в исследование.
- Отсутствие полного контроля астмы.
- Значение ОФВ1 от 50 до 90 % перед включением в исследование.
- В анамнезе должно быть не менее 1 обострения астмы за последний год.
- Мужчины и женщины детородного возраста не должны планировать деторождение на период исследования, а при включении в исследование должны

использовать адекватные меры контрацепции (кроме приема оральных контрацептивов).

- Пациенты должны быть в достаточной степени мобильными, чтобы следовать графику визитов.
- Больные должны быть в состоянии дать информированное согласие, и это согласие должно быть получено до начала какой-либо скрининговой процедуры.

#### Критерии исключения

- Одновременное участие в другом клиническом исследовании
- Несоответствие критериям включения
- Наличие серьезных инфекций типа гепатита, пневмонии, пиелонефрита, Herpes Zoster в предшествующие скринингу 3 месяца
- Тяжелое соматическое состояние, обусловленное прогрессирующими заболеваниями печени, сердечно-сосудистой системы, почек, органов дыхания, системы крови, а также эндокринного или церебрального происхождения
- Любое известное злокачественное заболевание или наличие анамнеза рака в течение предшествующих 5 лет
- Наличие активного алкоголизма или признаков алкогольного поражения печени
- Наличие острого инфекционного заболевания
- Любая вакцинация в предшествующие 3 месяца

У 23 пациентов была аллергическая форма БА, из которых 16 получали комбинированную терапию аутологичными Т-лимфоцитами и стандартное лечение и 7 получали только стандартную терапию, ещё 7 пациентов, страдавших неаллергической формой БА, также получали комбинированную терапию. Полная характеристика пациентов с БА, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика пациентов с бронхиальной астмой, включенных в исследование.

Приглашено в исследование:	47 человек			
Исключено:	2 – отказ от исследования 2 – другие причины (хр.ВЭБ-инфекция, онкология)			
Распределили:	Аллергическая БА 23		Неаллергическая БА 7	Доноры 13
	Комбинированная терапия 16	Стандартное лечение 7	Комбинированная терапия 7	
Возраст	37,2 (23–59)	45,4 (23–61)	55 (43–62)	28 (21–43)
Пол:				
мужчины	6	1	0	2
Женщины	10	6	7	10
Степень тяжести:				
Средняя	13	7	7	
Тяжелая	3	-	-	

Диагноз БА был установлен не менее чем за 12 месяцев до включения в исследование. Все пациенты принимали базисную терапию ИГКС не менее 12 недель до начала исследования. Степень тяжести БА у пациентов, оценивалась в зависимости от ступени терапии, в соответствии с которой они уже получали лечение. Из 30 пациентов, страдающих БА, 27 наблюдались со средней степенью тяжести заболевания – они получали лечение по 3 ступени (комбинация ИГКС-ДДБА ежедневно, антилейкотриеновые препараты), и 3 - с тяжелой степенью – лечение по 4-5 ступени (средние и высокие дозы ИГКС-ДДБА ежедневно, тиотропия бромид).

После рекрутирования в исследование пациентам с БА подкожно вводили активированные аутологичные Т-лимфоциты с кратностью 1 раз в неделю – 4 инъекции, далее 1 раз в месяц – 6 инъекций, всего 10 инъекций. Терапия активированными аутологичными Т-лимфоцитами проводилась на фоне стандартной терапии, в которую входило лечение ингаляционными глюкокортикостероидами,  $\beta$ 2-адреномиметиками короткого и длительного действия, антилейкотриеновыми препаратами. Контрольная группа была



*Способ получения активированных аутологичных Т-лимфоцитов*

Забор 200 мл периферической крови проводился под контролем врача. Лейковзвесь, полученную из крови, собирали, разбавляли забуференным физиологическим раствором с 2% ЭДТА (ЗФР-ЭДТА), с содержанием гентамицина (50 мкг/мл), тиенама (25 мкг/мл) и 0,5%FBS (FetalBovineSerum, HyClone); центрифугировали в градиенте плотности стерильного раствора LSM (LymphocyteSeparationMedium, MP Biomedicals, США). Образовавшееся кольцо мононуклеарных клеток собирали и отмывали трижды ЗФР-ЭДТА. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл полной среды RPMI 1640 (HyClone, США), содержащей 2мМ L-глутамин, 25 мкг/мл тиенама, 50 мкг/мл гентамицина и подсчитывали количество клеток в камере Горяева. Полученные МНК культивировали в культуральные флаконы (TPP, Швейцария) из расчета 2 млн клеток на 1 мл полной среды с 10% FBS и активаторами (1 мкл/мл антиCD3 антител (НПЦ МедБио Спектр, Москва) и 50 ед/мл IL-2 (ООО Биотех, Россия).

На 5–6 день (по состоянию культуры) заменяли 70% среды на новую с таким же составом. На 10–14 день клетки собирали, после осаждения фасовали 30 млн клеток на 1 мл в криопробирки, содержащие 10% раствор стерильного человеческого альбумина и 10% DMSO (Riedel-deHaën, Германия). Клетки хранили при -80°C в низкотемпературном холодильнике (SANYO, Япония). Перед введением клетки размораживали, к клеткам добавляли 10 мл физиологического раствора, осаждали в течение 5 минут при 1 тыс. об/мин, ресуспендировали в 2 мл физиологического раствора и в таком виде вводили пациентам. Активированные аутологичные Т-лимфоциты вводили подкожно в количестве 30 млн клеток с кратностью 1 раз в неделю №4, затем 1 раз в месяц, №6. Всего 10 инъекций.

Оценка состояния пациентов в процессе лечения проводилась по клиническим и лабораторным показателям после 5 и 10 введения препарата. Врачебный осмотр проводился перед каждой инъекцией. Возникновение местных и общих побочных реакций отслеживалось после каждого введения иммунотерапии, пациенты находились под наблюдением в течение 30 минут.

Для оценки иммунного статуса периферическую кровь здоровых доноров и больных забирали из локтевой вены в вакуумную пробирку с антикоагулянтом (литий гепарином), перемешивали, забирали 50 мкл для определения количества лимфоцитов. Затем добавляли 10% р-р желатина (до 1% концентрации) и инкубировали 35 мин при 37°C и дальше проводили оценку разных звеньев иммунной системы.

В оценку врожденной и адаптивной иммунной системы включались показатели:

- абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови;
- популяционный состав лимфоцитов:
  - относительное содержание CD3<sup>+</sup>T-лимфоцитов и их субпопуляций: хелперных CD4<sup>+</sup>T-лимфоцитов и цитотоксических CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов;
  - относительное содержание CD19<sup>+</sup>B-лимфоцитов;
  - относительное содержание CD16<sup>+</sup>NK-клеток;
- иммунорегуляторный индекс: соотношение CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>T-лимфоцитов;
- уровни IgM, IgG, IgA и IgE в сыворотке крови;
- фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов.

Определение иммунного статуса проводилось сотрудниками лаборатории клинической иммунологии Клиники иммунопатологии НИИФКИ под руководством заведующей лабораторией Пронкиной Н. В.

#### *Определение количества лимфоцитов*

Кровь для определения абсолютного количества лимфоцитов переносили в пластиковые пробирки для иммуноцитометрии, метили антителами к поверхностным антигенам. Количество лейкоцитов считали в камере Горяева, а процент лимфоцитов определяли с помощью проточного цитометра BD FACS Canto II (BectonDickinson, USA) в программе BD FacsDiva (BectonDickinson, USA), используя параметры прямого (FSC), бокового (SSC) светорассеяния и канал флюоресценции по маркеру CD45. Комбинации регионов, соответствующие распределению лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов графика FSC против SSC,

и ядерных клеток графика CD45 против SSC комбинировали в гейты лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов, соответственно. Соотношение гейтов приводили к 100%, высчитывали % лимфоцитов и, через общее количество клеток, - абсолютное их количество.

#### *Определение популяционного состава лимфоцитов*

Кровь для поверхностного маркирования переносили в цитометрические пробирки, метили антителами к CD3, CD4, CD8, CD16, CD19 (BD Bioscience, США), инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Количество антител брали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Без проведения отмывки добавляли лизирующий раствор, чтобы удалить эритроциты, и проводили анализ с помощью проточного цитометра.

#### *Определение уровня иммуноглобулинов сыворотки*

Уровень иммуноглобулинов классов А, М, G, Е в сыворотке крови определялся на иммунохимическом анализаторе Image 800 с использованием набора реагентов для определения содержания иммуноглобулинов классов А, М, G, Е (BeckmanCoulter, США) согласно инструкции.

#### *Исследование фагоцитоза*

Лейковзвесь для исследования фагоцитоза помещали в лунки планшета для иммунологических реакций (Медполимер, Санкт-Петербург), содержащие по 10 мкл латекса, нагруженного гамма-глобулином (Биопрепарат, Санкт-Петербург), меченным FITC. Планшет инкубировали 1 час при 37°C во влажной камере, клетки суспендировали и переносили в цитометрические пробирки, содержащие 450 мкл лизирующе-фиксирующего раствора. После 15 мин инкубации при комнатной температуре материал хранили при 4°C в течение дня до исследования. Иммуноцитометрию проводили с использованием параметров светорассеяния (FSC и SSC) для выделения областей моноцитов и гранулоцитов, из которых

строили гистограммы по каналу флюоресценции FITC для определения процента светящихся клеток.

Исследование фагоцитоза проводили методом проточной цитометрии с использованием коммерческого набора Phagotest «Celonic». Это набор реагентов, позволяющий количественно определять фагоцитирующую функцию лейкоцитов в гепаринизированной цельной крови. Набор содержит флуоресцеин (FITC)-меченые опсонизированные бактерии *E.coli* и необходимые реагенты для оценки продукции свободных форм кислорода фагоцитирующими клетками. Он измеряет общий процент моноцитов и гранулоцитов, осуществляющих фагоцитоз в целом и фагоцитарное число (количество бактерий в клетке).

*Определение относительного количества субпопуляций В-клеток и экспрессии молекулы CD23*

Для определения относительного количества В1- (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) и В2- (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) лимфоцитов, а также экспрессии Foxp3 в В-клетках и Т-клетках, экспрессии CD23 (мембраносвязанный низкоаффинный рецептор IgE) использовали 1 млн МНК и протокол внутриклеточного окрашивания маркеров. Клетки окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3, CD19, CD5, CD23 в течение 20 минут при комнатной температуре. Затем проводили отмывку клеток 1 мл Staining Buffer при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость убирали, осадок ресуспендировали. После чего клетки фиксировали и пермеабелизировали набором буферов True Nuclear Factorkit (BioLegend, США) согласно инструкции производителя. Проводили окрашивание антителами к Foxp3, инкубировали 30 минут в темноте при комнатной температуре. Отмывали клетки 1 мл пермеабелизирующего раствора, центрифугировали при 300g 5 минут. К осадку добавляли 250 мкл Staining Buffer и проводили цитометрический анализ.

*Определение содержания перфорина и гранзима В в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитах*

Окрашивали выделенные из периферической крови МНК ( $1 \cdot 10^6$ ) антителами к поверхностным маркерам CD3, CD8. Отмывали 1 мл StainingBuffer, центрифугировали 5 мин при 300g. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали. Для фиксации клеток вносили 250 мкл CytoFix/CytoPerm буфера, инкубировали 20 минут при 4°C. Затем клетки отмывали дважды в 1 мл 1x Perm/Wash буфера, центрифугировали 5 минут при 250g. Ресуспендировали осадок в 50 мкл 1x Perm/Wash буфера, часть клеток переносили в другую пробирку для окрашивания изотипическими антителами (изотипический контроль). К остальным клеткам добавляли антитела против внутриклеточных гранул перфорина и гранзима В. Инкубировали клетки 30 минут при 4°C. Затем отмывали 1 мл 1x Perm/Wash буфера, центрифугировали 5 минут при 250g. Вносили 250 мкл 1x Perm/Wash буфера и проводили анализ на проточном цитометре FACS Canto II (BD, США).

*Определение уровня экспрессии HLA-DR, CD25 и PD-1 на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоцитах и регуляторных Т-клетках*

Выделенные из периферической крови МНК в количестве 1 млн клеток переносили в цитометрические пробирки и окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3, CD4, CD25, CD127, HLA-DR и PD-1 в течение 20 минут при комнатной температуре. Для определения негативной популяции по HLA-DR и PD-1 использовали FMO-контроли (FluorescenceMinus One – это клетки, окрашенные всеми антителами за исключением маркера, для которого необходимо определить негативную популяцию). Затем проводили отмывку клеток 1 мл StainingBuffer (3ФР с 0,2% EDTA и 0,5% FCS) при 1000 об/мин в течение 5 минут. Надосадочную жидкость убрали, осадок ресуспендировали. Для анализа на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США) вносили 250 мкл StainingBuffer. Регуляторные Т-клетки фенотипировали как CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>. Для сравнения помимо клеток

пациентов с БА на разной терапии использовали клетки условно-здоровых доноров.

#### *Субъективная оценка состояния пациентов*

Контроль над БА оценивался по опроснику ACQ5, включающему 5 вопросов, чем ниже балл, тем уровень контроля лучше, разница в 0,5 балла является клинически значимой.

Исследование качества жизни проводилось при помощи опросника AQLQ(S). Опросник содержит 32 вопроса, сгруппированных в 4 блока, затрагивающих наиболее значимые для больных БА области жизни. Так, первый блок позволяет оценить выраженность симптомов болезни (12 вопросов), второй – ограничение активности вследствие заболевания (11 вопросов), третий – эмоциональное состояние (5 вопросов), четвертый – зависимость от влияния окружающей среды (4 вопроса). Каждый вопрос оценивают по 7 балльной шкале ответов (1 балл – максимальное влияние БА, 7 – отсутствие такового). Чем выше набранный балл, тем лучше качество жизни.

#### *Оценка функции внешнего дыхания*

Функция внешнего дыхания оценивалась с помощью инструментального обследования - спирометрии и пробы с бронхолитиком. Фиксация данных обследования функции внешнего дыхания проводилась на персональном компьютере посредством диагностической программы «Spida\_5». Методика компьютерной спирометрии позволяла определить жизненную емкость легких (ЖЕЛ), форсированную жизненную емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>), отношение ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ (индекс Тиффно). Проба с бронхолитиком Сальбутамол использовалась с целью оценки обратимости обструкции.

*Статистическая обработка данных*

Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием статистической программы Statistica (StatSoft), версия 6.0. Проверку выборки на нормальность распределения осуществляли с использованием критерия Шапиро–Уилка (для малых выборок). Данные непараметрических тестов представлены в виде медианы (Me) и значений квартильного диапазона (25%; 75%). Для оценки результатов исследований использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Характеристика иммунологического и клинического статуса пациентов с БА до лечения

При оценке иммунного статуса у пациентов до включения в группы проводилось определение параметров клеточного иммунного ответа, таких как абсолютный лимфоцитоз, популяционный состав Т-лимфоцитов: оценивалось относительное количество Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов среди лимфоцитов, а также иммунорегуляторный индекс (ИРИ) – соотношение Т-хелперов к цитотоксическим Т-лимфоцитам. Показатели Т-клеточного звена у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА находились в пределах нормы в соответствии с референсными значениями, между группами с разными формами астмы достоверных отличий не отмечалось (Табл. 2). Также при оценке иммунологического статуса определялись показатели гуморального звена иммунного ответа: относительное количество CD19<sup>+</sup> В-лимфоцитов, общий уровень иммуноглобулинов класса Е, М, А, G в сыворотке крови. У пациентов с аллергической формой БА отмечалось превышение нормативного диапазона по количеству В-лимфоцитов и уровня общего IgE (Табл. 2), что объяснимо с точки зрения патогенеза аллергических заболеваний с преобладанием гуморального IgE-опосредованного иммунного ответа и дисбалансом в сторону Th-2-зависимых реакций. При неаллергической форме астмы данные показатели были в пределах референсных значений. При сравнении между группами с аллергической формой БА статистически достоверных отличий не выявлялось. В состав иммунного статуса входила также оценка показателей врожденного клеточного иммунитета. Достоверных отличий по показателям врожденного иммунного ответа (количество НК-клеток, уровень фагоцитирующей активности нейтрофилов и моноцитов) не было выявлено между группами с разными формами БА. Следовательно, группы пациентов с аллергической и неаллергической БА отличались только по показателям гуморального звена, остальные показатели без достоверных отличий, что подтверждает наличие аллергического воспаления и исключает наличие других грубых дефектов

иммунной системы. За исключением показателей гуморального звена, остальные параметры иммунного статуса (количество лимфоцитов, субпопуляционный состав лимфоцитов, уровни иммуноглобулинов М, А, G сыворотки, показатели фагоцитоза) у пациентов до лечения были в пределах нормальных значений. У нескольких пациентов также наблюдалось снижение фагоцитарной функции, тем не менее в общей группе показатели также были в пределах нормы (Табл. 2).

Таблица 2. Показатели иммунного статуса пациентов с аллергической и неаллергической формами бронхиальной астмы до лечения

Показатель	Аллергическая форма (n=16)	Неаллергическая форма (n=7)	Нормативный диапазон
Количество лимфоцитов (клетки/мм <sup>3</sup> )	1937 (1605,5–2521,5)	1892 (1400–2211)	1120–3210
CD3 <sup>+</sup> T-лимфоциты (%)	77 (68–80)	76 (57–82)	58–83
CD4 <sup>+</sup> T-лимфоциты (%)	45,5 (40,5–53,5)	48 (37–50)	29–59
CD8 <sup>+</sup> T-лимфоциты (%)	25,5 (20,5–27)	32 (19–37)	17–40
CD19 <sup>+</sup> B-лимфоциты (%)	<b>14 (10–17,5)</b>	11 (9–14)	4,5–13
CD16 <sup>+</sup> НК-клетки (%)	12 (7,5–22,5)	12 (9–26)	6–24
Фагоцитарная активность гранулоцитов (%)	88,5 (69–91)	93 (81–95)	87–99
Фагоцитарная активность моноцитов (%)	86,5 (64,5–89,5)	87 (70–93)	74–95
IgA (г/л)	1,67 (1,02–2,5)	1,68 (1,52–3,2)	0,68–3,68
IgM(г/л)	1,36 (0,93–2,1)	1,13 (0,65–1,85)	0,6–2,63
IgG(г/л)	12,35 (11,55–13,5)	10,6(10,1–10,9)	6,94–16,18
IgE (МЕ/л)	<b>231 (58–3000)</b>	56 (13–116)	<130

Примечание: Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

Показатели функции внешнего дыхания, в частности  $ОФВ_1$ , до начала лечения у пациентов с аллергической формой в среднем составлял 94%, и 86% при неаллергической форме.

До лечения средний балл по опроснику ACQ5 по контролю над БА, включающему 5 вопросов, у пациентов составлял 2,02, чем ниже балл, тем уровень контроля лучше.

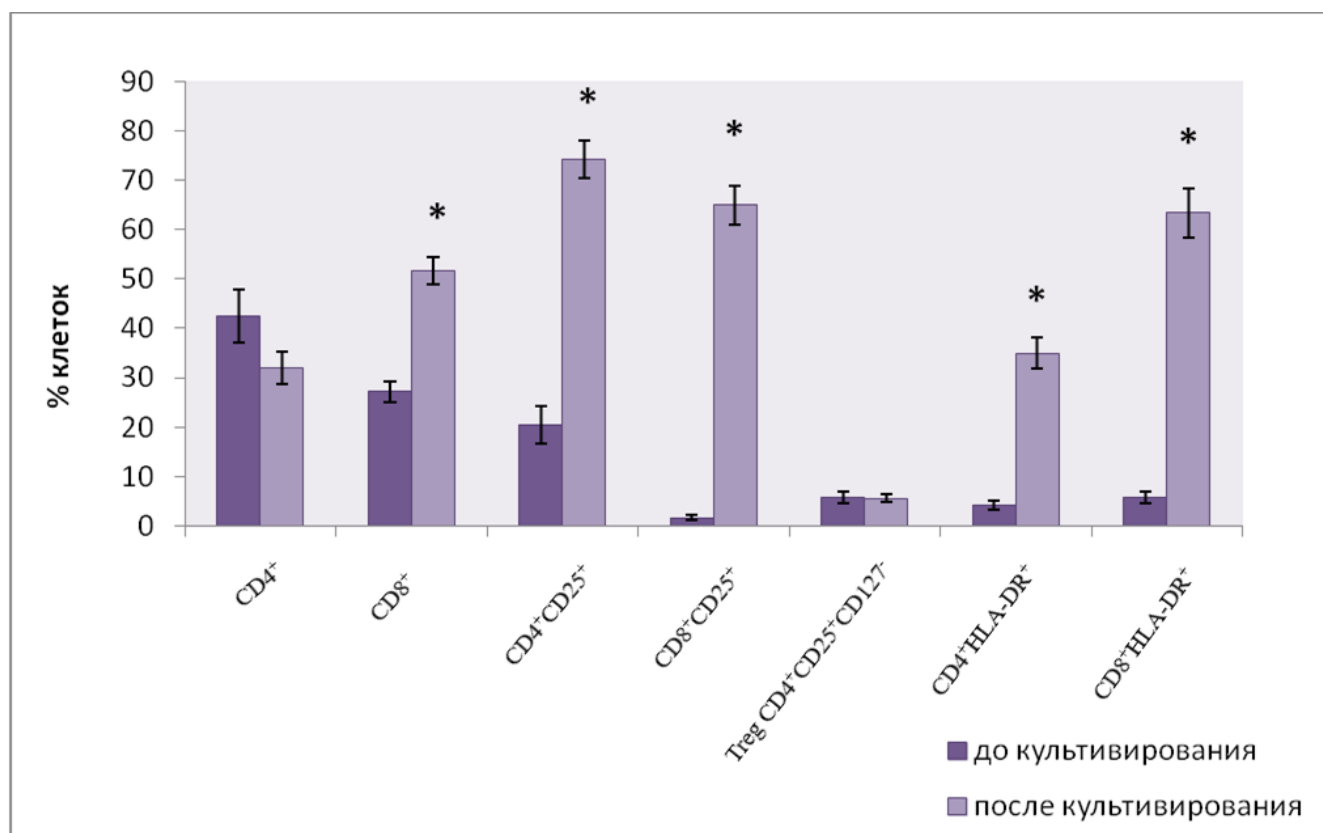
По данным опросника AQLQ(S) до начала терапии пациенты отмечали ограничения в своей повседневной деятельности: среднее значение шкалы «активность» составило  $4,8 \pm 0,49$  балла; страдали от симптомов болезни:  $5,4 \pm 0,37$  балла; испытывали эмоциональный стресс вследствие удушья, приступов затрудненного дыхания, одышки, кашля, это шкала «эмоции» –  $5,2 \pm 0,42$  балла; тяжело переносили негативное влияние факторов окружающей среды:  $4,88 \pm 0,37$  балла. Чем выше балл, тем лучше качество жизни, максимальный балл 7.

### 3.2 Характеристика аутологичных активированных Т-клеток пациентов с БА, предназначенных для терапии

Протокол получения аутологичных активированных Т-клеток изложен в главе 2 раздела Материалы и методы. В качестве активаторов Т-клеток использовали очищенные моноклональные антитела к CD3 и человеческий рекомбинантный ИЛ-2. Протокол культивирования по продолжительности составлял 10 дней.

Культивированные клетки, предназначенные для введения пациентам, преимущественно были представлены  $CD3^+$ -лимфоцитами (более 85% из лимфоцитарного гейта). При этом содержание  $CD4^+$ -клеток составило  $34 \pm 4,0$  %,  $CD8^+$ -клеток -  $58 \pm 2,0$  %, то есть в культуре количество  $CD8^+$ -лимфоцитов стало достоверно больше почти в 2 раза по сравнению с числом  $CD8^+$ -лимфоцитов до культивирования, что может означать активацию цитотоксического иммунного ответа (Рис. 2).

Рисунок 2. Характеристика клеток, стимулированных *in vitro* анти-CD3 антителами и рекомбинантным человеческим IL-2, предназначенных для введения пациентам с бронхиальной астмой.



Примечание:

\* - достоверные отличия при сравнении с показателями до культивирования,  $p < 0,05$ . Критерий Вилкоксона.

Также после стимуляции *in vitro* наблюдалось увеличение экспрессии эрготоп-ассоциированных маркеров ранней и поздней активации CD25, HLA-DR на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитах, что отражает активацию Т-клеток. Уровень регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>Т-клеток до и после культивирования оставался в пределах одних и тех же значений. Следовательно, доля клеток с супрессивной активностью в получаемой нами культуре не возрастала. Таким образом, в результате 10-дневной стимуляции анти-CD3 антителами и рекомбинантным человеческим IL-2 у Т-клеток пациентов с БА существенно увеличилась экспрессия CD25 и HLA-DR, что говорит об их активированном состоянии и потенциальной возможности индуцировать антиэрготипический ответ при введении в организм.

### 3.3 Переносимость иммунотерапии

Введение аутологичных активированных Т-лимфоцитов пациентам с БА осуществляли по схеме: индукционный курс - 1 инъекция в неделю, кратностью 4 раза; затем поддерживающий курс - 1 инъекция в месяц, кратностью 6 раз. Клетки в количестве 30 млн в 2 мл стерильного физиологического раствора вводились пациентам подкожно в предплечье. После введения в течение 15–30 минут оценивались местные побочные реакции, и в течение суток оценивалось развитие системных реакций (субфебрилитет, астенический синдром) и обострение основного заболевания. Иммунотерапия аутологичными активированными Т-клетками характеризовалась хорошей переносимостью. Местные побочные реакции в виде покраснения, припухлости и болезненности в месте введения были зарегистрированы у 3 пациентов, то есть в 13% случаев. Системных проявлений зафиксировано не было (Табл. 3).

Таблица 3. Поствакцинальные реакции на фоне иммунотерапии активированными Т-клетками.

Тип реакции	Количество пациентов (n, %)
<b>Локальная</b>	
Покраснение	2/23 (8,7%)
Припухлость	2/23 (8,7%)
Болезненность	3/23 (13%)
<b>Системная</b>	
Субфебрилитет	0/23 (0%)
Астенический синдром	0/23 (0%)
Обострение основного заболевания	0/23 (0%)

Обострений в виде эпизодов нарастающей одышки, кашля, свистящих хрипов, или заложенности в грудной клетке, повышенной потребности в использовании КДБА, сопровождающихся снижением ОФВ<sub>1</sub>, требующих изменений обычного режима терапии у пациентов зафиксировано не было. Отмечалось однократное использование КДБА (Сальбутамол, Вентолин) на фоне

сезонной вирусной инфекции у 57,1% (4 из 7) пациентов, получавших только стандартную терапию, 31,25% (5 из 16) пациентов с аллергической формой БА, находившихся на комбинированной терапии, и 28,6% (2 из 7) пациентов с неаллергической формой БА, также на комбинированной терапии. Однако частота применения КДБА в группе пациентов с аллергической БА на комбинированной терапии достоверно не отличалась от таковой в группе пациентов с аллергической БА на стандартной терапии (критерий Хи-квадрат  $\chi^2 = 1,371$ ,  $p = 0,242$ ).

3.4 Динамика показателей иммунного статуса у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА в ходе иммунотерапии активированными Т-лимфоцитами, в сравнении с пациентами с аллергической формой БА, получавшими стандартное лечение

Определение иммунологических показателей проводилось на протяжении всего курса комбинированной терапии, первая точка контроля перед первым введением вакцины, вторая - на 5 введении через 2 месяца от начала терапии и третья точка контроля проводилась на 10 введении через 7 месяцев. При оценке популяционного состава у группы пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы в ходе иммунотерапии отмечалась тенденция к увеличению Т-лимфоцитов через 2 месяца от начала терапии, а через семь месяцев наблюдалось достоверное повышение числа данных клеток по сравнению с показателями до терапии. В группе пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы на стандартной терапии достоверно увеличивался через 7 месяцев уровень НК-клеток, в то время как уровень Т-лимфоцитов не изменялся (Табл.4).

Таблица 4. Популяционный состав иммунокомпетентных клеток периферической крови пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма		
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)		
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев
Абсолютное количество лимфоцитов	1937 (1606–2522)	2134 (1719–2639)	2213 (1674–4046)	2275 (2160–2542)	2102 (1632–2482)	1828 (1540–2024)	1892 (1400–2211)	1898 (1850–2520)	2288 (1472–3132)
CD3 <sup>+</sup> (%)	75,5 (69–78,5)	78 (73–82)	<b>77,5</b> <b>(74,5–81,5) *</b>	77 (74–79)	77 (74–77)	74,5 (71–80)	76 (57–82)	77 (68–80)	80 (65–81)
CD4 <sup>+</sup> (%)	45,5 (40,5–53,5)	51 (44–58,5)	47,5 (44,5–54)	46 (44–52)	49 (37–52)	48 (43–52)	48 (37–50)	45 (44–51)	47 (46–49)
CD8 <sup>+</sup> (%)	25,5 (20,5–27)	25,5 (20,5–32)	25,5 (22,5–34)	29 (23–32)	26 (21–33)	23,5 (21–27)	32 (19–37)	31 (25–35)	30 (22–37)
ИРИ	1,83 (1,48–2,27)	2,05 (1,41–2,92)	1,9 (1,39–2,26)	1,6 (1,43–2,2)	1,76 (1,33–2,3)	1,96 (1,63–2,48)	1,56 (1,2–2,18)	1,6 (1,26–1,8)	1,6 (1,21–2,41)
CD19 <sup>+</sup> (%)	14 (10–17,5)	13 (10,5–14,5)	12 (8,5–14)	15 (9–17)	14 (9–16)	14 (7–15)	11 (9–14)	11 (10–14)	9 (9–14)
CD16 <sup>+</sup> (%)	12 (7,5–22,5)	9,5 (6–17)	9,5 (7,5–12,5)	7 (6–12)	8 (7–12)	<b>10,5</b> <b>(7–12) *</b>	12 (9–26)	15 (7–16)	10 (6–18)

Примечание:

\* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

Данные изменения связаны с активацией клеточного иммунного ответа, что связано именно с применением иммунотерапии на основе аутологичных активированных клеток, а не с базисной терапией, на которой находились

пациенты обеих групп в течение всего срока исследования.

Далее нами проводилась сравнительная оценка иммунологических параметров групп пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы, получавших комбинированную терапию с группой пациентов с неаллергической формой, также получавших иммунотерапию (Табл.4).

Как было отмечено выше, при оценке количественных показателей популяций лимфоцитов у пациентов с аллергической формой БА в динамике иммунотерапии отмечалось увеличение уровня Т-лимфоцитов через 2 месяца по сравнению со значением до терапии. При этом у пациентов с неаллергической формой достоверных изменений в субпопуляционном составе лимфоцитов в процессе иммунотерапии не выявлено.

3.4.3 Сравнительная характеристика уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови групп пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

При оценке гуморального статуса проводилось определение общего уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови классов E, A, M, G. У пациентов, планирующих иммунотерапию, среднее значение составило 231 (58–3000) МЕ/мл, в то время как на стандартной терапии в пределах нормальных значений. Разницу можно объяснить тем, что при наборе групп предпочтение взятия на иммунотерапию отдавалось более тяжелым пациентам, с целью оказания наиболее эффективной помощи из гуманных соображений, а также, более высокой заинтересованностью в иммунотерапии таких пациентов, тогда как пациенты с более легким течением не испытывали необходимости в дополнительном виде терапии.

У пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы в группе, получавших комбинированную терапию достоверно снижался уровень IgE через 2 месяца и 7 месяцев от начала лечения, что может свидетельствовать об уменьшении выраженности иммунного ответа, опосредованного IgE-антителами,

и соответственно подавлению дальнейшего каскада реакций, приводящих к аллергическому воспалению и повреждению тканей. Уровень иммуноглобулина А повысился через 7 месяцев от начала лечения в группе пациентов с аллергической БА, получающих иммунотерапию (Табл.5).

Таблица 5. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели, % клеток	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА		
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартная терапия (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)		
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев
Ig E (МЕ/мл)	231 (58– 3000)	<b>163</b> <b>(65– 1721) *</b>	<b>145,5</b> <b>(72– 1357) *</b>	84 (32– 228)	90 (13– 326)	75 (11– 184)	56 (13– 116)	55 (11– 122)	55 (19–97)
IgM (г/л)	1,4 (0,93– 2,1)	1,2 (0,91– 1,92)	1,3 (0,85– 2,01)	1,5 (1,16– 1,58)	1,5 (1,17– 1,72)	1,4 (0,97– 1,56)	1,2 (0,65– 1,85)	1,4 (0,83– 1,86)	0,95 (0,82– 1,77)
IgA (г/л)	1,7 (1,02– 2,5)	2,2 (1,78– 2,47)	<b>3,0</b> <b>(2,1– 3,6) *</b>	1,7 (1,37– 2,56)	2,1 (1,68– 3,49)	1,8 (1,46– 3,09)	1,7 (1,52– 3,2)	1,7 (1,59– 2,98)	1,9 (1,82– 3,35)
IgG (г/л)	12,4 (11,6– 13,5)	12,4 (10,9– 13,6)	12,9 (12,3– 14,5)	9,7 (9,43– 10,6)	10,2 (9,51– 10,6)	9,7 (9,37– 10,3)	10,6 (10,1– 10,9)	10,1 (8,87– 10,3)	10,2 (8,93– 12,1)

Примечание:

\* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

Данные изменения могут быть связаны с переключением выработки с IgE на IgA и активацией местных факторов естественной защиты, поскольку основная доля IgA присутствует в секретах слизистых оболочек, выполняя связывание и нейтрализацию патогенов на данной поверхности, прежде всего нейтрализации вирусных и бактериальных токсинов. В группе получавших стандартное лечение достоверных изменений в динамике терапии нет.

При оценке гуморального статуса у групп пациентов, получавших комбинированную терапию, с аллергической и неаллергической формой БА, также проводилось определение общего уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови классов E, A, M, G. У пациентов с аллергической БА в динамике иммунотерапии отмечалось достоверное уменьшение уровня IgE через 2 месяца и 7 месяцев от начала лечения, достоверное увеличение IgA через 7 месяцев от начала лечения, тогда как у пациентов с неаллергической формой БА в динамике иммунотерапии достоверных изменений не отмечалось (Табл.5).

Сравнение между группами при оценке аллергической и неаллергической форм БА показывало существенные отличия уровня IgE до терапии в связи с различными патогенетическими механизмами заболевания. Уровень IgE при аллергической форме был достоверно выше, чем при неаллергической форме БА, который находился в пределах нормальных значений: 56 (13–116) МЕ/мл. Нормативный диапазон для IgE составлял менее 130 МЕ/мл.

3.4.5 Оценка динамики фагоцитоза гранулоцитов и моноцитов у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА в процессе иммунотерапии

Проводилась оценка количества фагоцитирующих клеток у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших комбинированную терапию. В процессе иммунотерапии через 2 месяца отмечается снижение количества фагоцитирующих гранулоцитов и моноцитов, однако наблюдаемое снижение сохранялось в пределах нормативных значений. Далее через 7 месяцев отмечается повышение относительного количества фагоцитирующих клеток, и в том числе достоверно повышается количество фагоцитирующих гранулоцитов у пациентов с аллергической формой БА по сравнению с показателями до лечения, что свидетельствует о стимулирующем действии проводимой иммунотерапии на показатели фагоцитарной функции. У пациентов с неаллергической формой БА достоверных изменений нет (Табл.6).

Таблица 6. Количество фагоцитирующих гранулоцитов и моноцитов у пациентов с аллергической и неаллергической формой БА, получавших комбинированную терапию

Показатели, % клеток	Аллергическая форма БА (n = 16)			Неаллергическая форма БА (n = 7)		
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев
Фагоцитоз (гранулоциты)	88,5 (64–91,5)	<b>84</b> <b>(67–89) *</b>	<b>92</b> <b>(88–94,5) *</b>	93 (81–95)	92 (75–97)	92,5 (88–96)
Фагоцитоз (моноциты)	86,5 (64,5– 91)	<b>78</b> <b>(50–91) *</b>	87,5 (81,5–90,5)	87 (70–93)	93 (88–94)	88,5 (86–91)

Примечание:

\* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

3.5 Динамика маркеров активации HLA-DR, CD25 и PD-1 на CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоцитах и количество регуляторных Т-клеток у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА при проведении иммунотерапии, в сравнении с пациентами на стандартном лечении и с донорами

Поскольку в динамике комбинированной терапии наблюдалось увеличение доли Т-лимфоцитов в периферической крови у пациентов, следующим этапом исследования была оценка фенотипических особенностей Т-клеток при терапии аутологичными активированными Т-клетками. Был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии HLA-DR, CD25 и PD-1 на хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитах и регуляторных Т-клетках. Молекула CD25 является ранним маркером активации, экспрессируется в том числе на активированных Т-клетках, тогда как HLA-DR - маркером поздней активации. Молекула PD-1 (programmed death) также участвует в регуляции Т-клеточной активации, являясь одной из чекпойнт-молекул при реализации иммунного ответа.

В первую очередь нами проводилась оценка количества Т-лимфоцитов разных субпопуляций, экспрессирующих CD25, HLA-DR, PD-1 у пациентов с

аллергической формой в динамике комбинированной терапии и стандартного лечения.

У пациентов с аллергической формой БА в динамике иммунотерапии статистически значимо повышалось относительное количество  $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD25, через 7 месяцев по сравнению с уровнем до терапии (Табл.7). Также отмечалось достоверное снижение  $CD8^+CD25^+$ Т-клеток через 7 месяцев по сравнению с уровнем до лечения. При этом в динамике иммунотерапии количество регуляторных Т-клеток и относительное содержание PD-1<sup>+</sup> клеток среди различных субпопуляций Т-лимфоцитов значимо не менялось. Также не отмечалось достоверных отличий по количеству  $CD4^+$  и  $CD8^+$ Т-клеток, экспрессирующих HLA-DR через 2 месяца и 7 месяцев по сравнению с количеством до терапии.

У группы пациентов с аллергической формой БА, продолжавших стандартную терапию, в динамике отмечалось достоверное увеличение количества  $CD4^+$ Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1, через 2 месяца, но через 7 месяцев происходило снижение до уровня нормальных значений, сопоставимых с таковым у условно здоровых доноров. Количество цитотоксических лимфоцитов ( $CD8^+$ Т-лимфоцитов), экспрессирующих PD-1 и HLA-DR, достоверно снижалось через 7 месяцев по сравнению с показателями до лечения и через 2 месяца. Также отмечалось снижение  $CD4^+CD25^+$ Т-клеток через 7 месяцев стандартной терапии. Нами была проведена оценка данных показателей между указанными группами на точках контроля (до лечения, через 2 месяца и через 7 месяцев). До лечения и через 2 месяца отмечена достоверная разница между уровнем регуляторных Т-клеток пациентов с аллергической формой БА у групп, получавших иммунотерапию и на стандартной терапии. У пациентов на стандартной терапии до лечения уровень регуляторных Т-клеток выше, чем в группе с иммунотерапией, в динамике через 7 месяцев они снижались до уровня условно здоровых доноров. У пациентов, получавших иммунотерапию, уровень регуляторных Т-клеток весь период наблюдения сохранялся на одном уровне с донорами. Количество  $CD4^+$  Т-клеток, экспрессирующих CD25, у пациентов с аллергической формой БА,

получавших комбинированную терапию, достоверно выше через 7 месяцев по сравнению с группой пациентов с аллергической формой на стандартной терапии, что связано с введением активированных клеток на протяжении всего исследования. В группе пациентов с аллергической формой на стандартной терапии через 7 месяцев, наоборот, снижался до уровня, наблюдаемого у условно здоровых доноров. Количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1, через 2 месяца иммунотерапии достоверно ниже по сравнению с показателями при стандартной терапии через 2 месяца, но при этом к 7 месяцам эти значения уравнивались.

Таблица 7. Экспрессия маркеров CD25, HLA-DR, PD-1 на популяциях Т-клеток периферической крови доноров и пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели, % клеток	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА			Доноры (n=13)
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)			
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	
Treg(CD4 <sup>+</sup> C D25 <sup>+</sup> D127 <sup>-</sup> )	<b>5,5</b> (3,6–6,2)!	<b>5,3</b> (5,0–7,0) !!	6,1 (3,8–9,3)	<b>8,1</b> (7,4–9,2)!§	<b>8,8</b> (8,0–10,9)!!§	5,3 (3,5–5,7)	6,7 (4,8–6,7)	8,7 (7,6–11,9)	9,5 (6,6–9,8) #	4,9 (4,0–7,2)
Treg PD-1 <sup>+</sup>	9,0 (4,1–12,1)	6,0 (4,1–17,0)	9,5 (6,8–14,2)	8,6 (7,0–10,6)	<b>14,4</b> (8,5–19,2) §	7,6 (6,2–20,9)	9,9 (8,5–11,5)	8,4 (4,8–18,7)	9,1 (6,5–12,3)	5,8 (3,4–9,5)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	22,1(16,4 – 28,3)	22,7 (12,0–31,0)	<b>26,1 (12,4– 34,9) *!!!</b>	23,5 (16,2–45,5)	25,3 (19,3–29,5)	<b>7,8</b> (6,8–8,0)*τ	25,4 (20,3–26,4)	17,7 (15,1–45,4)	<b>32,3(31,6– 39,1) # §</b>	11,6 (7,4–25,4)
CD4 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	7,0 (3,9–9,75)	7,0 (3,3–9,2)	4,8 (3,3–7,4)	6,9 (5,9–14,1)	9,1 (5,3–12,3)	<b>9,8</b> (7,5–10,9)§	3,8 (3,1–11,8)	9,5 (3,0–11,9) #	6,3 (1,9–9,3) #	3,0 (1,9–3,9)
CD4 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup>	8,9 (6,9–12,5)	<b>6,0 (3,7– 12,3)!!</b>	7,1 (4,5–13,1)	<b>13,6</b> (9,2–15,0)§	<b>17,6 (12,1– 21,6)*§</b>	5,6 (5,5–7,6)	<b>11,0 (9,7– 15,1) §</b>	<b>10,8</b> (10,8–29,8) §	<b>10,0</b> (9,9–17,7)§	6,1 (4,3–7,9)
CD8 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	1,75 (1,1–3,9)	1,5 (0,7–2,6)	<b>1,3</b> (0,7–2,9) *	4,8 (2,2–8,9)	4,4 (1,1–6,5)	0,8 (0,6–4,1)	1,6 (1,1–1,6)	1,2 (0,5–2,9)	2,7 (2,7–5,4) #	2,5 (1,6–5,0)
CD8 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup>	10,4 (5,2–21,7)	9,0 (5,0–19,7)	12,1 (4,5–20,2)	<b>22,2 (14,0– 47,0) §</b>	20,7 (13,5–33,9)	<b>17,4 (14,4– 28,4) *τ</b>	12,0 (9,2–45,2)	26,7 (14,8–38,3) #	24,7 (6,9– 37,0) #	5,1 (4,3–9,0)
CD8 <sup>+</sup> PD-1 <sup>+</sup>	6,6 (4,5–14,1)	<b>7,5 (2,4– 12,8)!!</b>	6,8 (2,3–20,3)	<b>15,8 (12,2– 18,8)§</b>	<b>17,5</b> (11,7–19,8) §	<b>4,3 (4,0– 5,5) *τ</b>	10,7 (7,2–25,6)	<b>16,7</b> (13,8–24,3) §	10,8 (9,4–15,4)	7,4 (5,3–9,6)

Примечание: \* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона; # - тенденция по сравнению с показателями до лечения,  $p = 0,08$ , критерий Вилкоксона; τ - достоверные отличия по сравнению с показателями через 2 месяца,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона; § - достоверные отличия по сравнению с донорами,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни; ! - достоверные отличия от стандартной терапии до лечения,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни; !! - достоверные отличия от стандартной терапии через 2 месяца,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни; !!! - достоверные отличия от стандартной терапии через 7 месяцев,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни. При подсчете Treg (CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup>) за 100% была принята популяция CD4<sup>+</sup>клеток, при подсчете Treg PD-1<sup>+</sup> – Treg. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

Далее нами была проведена сравнительная оценка экспрессии маркеров активации на различных популяциях Т-лимфоцитов у групп пациентов с различными формами БА, получавших комбинированную терапию, и у условно-здоровых доноров. При оценке пациентов с неаллергической БА в динамике иммунотерапии достоверных отличий нет, но отмечалась тенденция к увеличению доли регуляторных Т-клеток, а также к увеличению количества CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих молекулы CD25, HLA-DR, и снижение количества CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1 через 7 месяцев (Табл.7).

При сравнении полученных данных между группами в точках контроля (до лечения, через 2 месяца и через 7 месяцев) было обнаружено следующее: у пациентов с неаллергической формой БА, получавших иммунотерапию, через 2 месяца отмечалось достоверное увеличение уровня экспрессии PD-1 на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитах по сравнению с донорами. Через 7 месяцев нами было отмечено увеличение относительного количества, экспрессирующих CD25, CD4<sup>+</sup>Т-лимфоцитов по сравнению с донорами, при этом доля экспрессирующих PD-1 CD4<sup>+</sup>Т-клеток снижалась, но оставалась достоверно увеличенной в сравнении с донорами. Достоверных различий по данным показателям между группами пациентов с различными формами БА обнаружено не было.

3.6 Динамика относительного количества субпопуляций В-клеток и экспрессии CD23 у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА при иммунотерапии и стандартном лечении в сравнении с донорами

Несмотря на то, что терапия аутологичными активированными Т-лимфоцитами прежде всего направлена на индукцию антиэрготипического ответа, а значит в итоге на снижение количества активированных Т-лимфоцитов, что предполагает прежде всего воздействие на Т-клеточное звено, необходимо было оценить и показатели гуморального иммунитета, поскольку, с одной стороны, компоненты иммунной системы находятся в тесной взаимосвязи друг с другом, полноценная активация В2-лимфоцитов невозможна без участия Т-хелперов, и, с другой стороны, данное звено является важным участником патогенеза БА,

особенно в случае аллергической формы. Поэтому следующим этапом нами проводилась оценка субпопуляционного состава В-лимфоцитов и количество клеток, экспрессирующих CD23 в динамике комбинированной терапии.

У пациентов с аллергической формой БА, получавших комбинированную терапию, относительное количество В1 клеток, экспрессирующих CD23, достоверно снижалось ( $p=0,024$ ) через 7 месяцев (Табл.8). Также достоверно снижалось ( $p=0,046$ ) и количество CD23<sup>+</sup> В2 клеток через 7 месяцев от начала терапии у группы пациентов с аллергической формой БА, получавших иммунотерапию. При этом в группе пациентов на стандартной терапии подобные изменения не были выявлены.

У пациентов, получавших стандартное лечение, уровень CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup> достоверно снижался через 2 месяца по сравнению с донорами, при этом через 7 месяцев достоверного отличия не отмечалось.

Достоверных различий между двумя группами пациентов, находившихся на иммунотерапии и получавших только стандартное лечение, обнаружено не было.

Таблица 8. Относительное количество В-клеток, экспрессия CD23 и Foxp3 в периферической крови доноров и пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели, % клеток	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА			Доноры (n=13)
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)			
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	
В1-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> )	1,7 (0,9–2,0)	2,2 (1,1–6,3)	2,2 (0,8–2,3)	2,2 (0,8–6,5)	2,8 (0,4–5,0)	2,3 (0,55–5,3)	1,15 (0,65–2,85)	2,1 (1,0–3,7)	1,4 (1,0–2,2)	1,2 (0,4–2,55)
CD23 <sup>+</sup> В1- клетки	7,8 (0–23,8)	4,9 (0,9–14,85)	<b>1,7</b> <b>(0,2–4,4) *</b>	1,55 (0–24,2)	0,15 (0–13,4)	0,05 (0–0,9)	2,55 (0–5,1)	0,8 (0,1–1,5)	3,45 (1,15–5,2)	1,35 (0,5–17,9)
В2-клетки (CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> )	10,2 (5,7–20,1)	12,0 (7,4–17,45)	11,6 (4,1–13,9)	9,7 (7,5–11,1)	6,3 (5,1–17,8)	7,1 (5,8–12,2)	11,1 (5,6–14,8)	7,5 (7,0–12,2)	7,5 (5,9–9,3)	6,4 (3,75–9,05)
CD23 <sup>+</sup> В2- клетки	5,8 (0–14,9)	1,9 (0,8–9,6)	<b>0,5</b> <b>(0,2–2,3) *</b>	1,4 (0,1–19,5)	0,2 (0,1–16,9)	0,05 (0–1,85)	2,45 (0,1–4,8)	0,65 (0,1–1,2)	0,3 (0,2–2,55)	0,75 (0,2–10,75)
CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>-</sup> FoxP3 <sup>+</sup>	0,4 (0,2–0,6)	0,5 (0,15–0,85)	1,0 (0,8–1,1)	0,3 (0,2–0,3)	<b>0,2</b> <b>(0,1–0,3) §</b>	0,2 (0,15–0,5)	0,9 (0,5–1,35)	0,4 (0,4–1,6)	0,6 (0,3–0,8)	0,65 (0,25–0,95)
CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> Fox P3 <sup>+</sup>	0,1 (0–0,1)	0,05 (0–0,1)	0,1 (0,1–0,2)	0,1 (0–0,5)	0,2 (0,1–0,2)	0,1 (0–0,25)	0,1 (0,1–0,75)	0,6 (0,1–0,8)	<b>0,3</b> <b>(0,1–0,4) !!!</b>	0,1 (0–0,3)

Примечание: § - достоверные отличия по сравнению с донорами,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни; \* - по сравнению с показателями до лечения,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона; !!! - достоверные отличия от аллергической формы через 7 месяцев,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни;. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль). При подсчете CD19<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> и CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> клеток за 100 % была принята популяция CD19<sup>+</sup>клеток

При оценке относительного количества субпопуляций В-клеток и количества В-клеток, экспрессирующих CD23, у пациентов с неаллергической формой БА достоверных отличий от доноров до начала терапии и изменений в динамике комбинированной терапии не наблюдалось (Табл.8). У пациентов с неаллергической формой БА уровень CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> достоверно повышался по сравнению через 7 месяцев от начала терапии у группы пациентов с аллергической формой БА, получавших иммунотерапию.

3.7 Определение содержания перфорина и гранзима В в CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> лимфоцитах у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА в динамике иммунотерапии и стандартного лечения в сравнении с донорами

Достоверных изменений в динамике комбинированной терапии относительного количества Т-лимфоцитов, содержащих перфорин и/или гранзим В, не было выявлено ни в случае Т-хелперной популяции, ни при оценке цитотоксических Т-лимфоцитов (Табл.9). Отмечалась тенденция к увеличению цитотоксических Т-лимфоцитов, содержащих перфорин и гранзим В у пациентов с аллергической формой БА, получавших комбинированную терапию. У пациентов с аллергической формой БА на стандартной терапии отмечалось достоверное увеличение доли CD8<sup>+</sup>, содержащих перфорин и гранзим В, через 2 и 7 месяцев по сравнению с уровнем до терапии, что говорит об активации цитотоксического Т-клеточного ответа на стандартном лечении. При этом достоверных различий между группами пациентов на иммунотерапии и получавших только стандартное лечение не было выявлено. Также не было обнаружено изменений данных показателей у пациентов обеих групп по сравнению с донорами.

Таблица 9. Содержание гранул перфорина и гранзима В в CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитах периферической крови доноров и пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели, % клеток	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА			Доноры (n=13)
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)			
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	
CD8 <sup>+</sup> Perf-Gr <sup>+</sup>	33,7 (20,7–43,7)	15,3 (9,1–33,2)	15,7 (12,6–36,6)	47,0 (23,7– 50,8)	35,75 (17,5– 52,4)	32,1 (17,6–58,3)	40,2 (26,0–49,8)	29,9 (27,5–69,2)	<b>23,05(12,0– 37,1) *</b>	21,9 (15,1– 30,45)
CD8 <sup>+</sup> Perf <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	9,8 (6,0–42,0)	12,2 (9,5–34,7)	<b>25,35 (8,9– 47,4) #</b>	6,1(0,5– 24,8)	<b>11,1 (6,0– 28,0) *</b>	<b>11,0 (6,0–22,7) *</b>	12,05 (7,6–26,7)	11,5 (1,9–36,5)	16,1 (7,5–40,9)	9,6 (3,7–21,2)
CD8 <sup>+</sup> Perf <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	0,3 (0,3–0,7)	0,5 (0,3–1,4)	1,05 (0,2–4,4)	0,2 (0–0,9)	0,1 (0,1–1,1)	0,1 (0,1–1,2)	0,25 (0,1–1,5)	0,6 (0,1–0,7)	0,25 (0,1–0,9)	0,2 (0,15–0,4)
CD4 <sup>+</sup> Perf-Gr <sup>+</sup>	9,7 (5,4–14,5)	5,7 (3,0–7,9)	7,65 (3,9–10,5)	12,6(3,6– 34,8)	16,4 (2,8– 28,5)	9,8 (4,5–16,6)	<b>21,55 (5,8– 25,2) §</b>	15,2 (6,3–35,0)	5,05 (2,1–13,5)	6,6 (4,0–11,95)
CD4 <sup>+</sup> Perf <sup>+</sup> Gr <sup>+</sup>	2,3 (0,4–9,2)	3,1 (1,2–12,7)	5,85 (1,3–11,65)	0,8(0,4– 8,0)	4,05 (1,4–11,1)	3,8 (1,2–12,2)	6,85 (0,5–13,8)	2,4 (1,2–3,1)	5,1 (0,9–10,3)	1,15 (0,6–4,55)
CD4 <sup>+</sup> Perf <sup>+</sup> Gr <sup>-</sup>	0,1 (0,1–0,7)	0,15 (0–1,0)	0,15 (0,05–0,8)	0,1 (0–0,7)	0,1 (0–0,5)	0,1 (0,1–0,6)	0,05 (0–0,4)	0,1 (0,1–0,5)	0,2 (0,1–0,2)	0,15 (0,05–0,2)

Примечание: \* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона; # - тенденция по сравнению с показателями до лечения,  $p = 0,08$ , критерий Вилкоксона; § - достоверные отличия по сравнению с донорами,  $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни. Perf<sup>+</sup> - перфорин содержащие клетки, Gr<sup>+</sup> - гранзим В содержащие клетки. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

Как было сказано выше, достоверных изменений по количеству Т-лимфоцитов, содержащих перфорин и гранзим В у пациентов с аллергической формой БА в динамике иммунотерапии не наблюдалось. В то же время у пациентов с неаллергической формой БА было отмечено достоверное снижение относительного количества CD8<sup>+</sup>Т-лимфоцитов, содержащих только гранзим В, через 7 месяцев после начала иммунотерапии (Табл.9). Уровень CD4<sup>+</sup>Perf<sup>+</sup>G $\gamma$ <sup>+</sup>клеток у пациентов с неаллергической формой БА до лечения был достоверно выше уровня доноров, но в динамике иммунотерапии через 2 и 7 месяцев снижался до уровня, сопоставимого с показателями у условно здоровых доноров.

3.8 Динамика клинических параметров у пациентов в ходе терапии активированными Т-лимфоцитами у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА и стандартном лечении

Для определения выраженности бронхиальной обструкции, степени тяжести течения БА и дальнейшего мониторинга функции легких методом выбора является спирометрия. При оценке функции внешнего дыхания оценивались такие основные параметры, как жизненная емкость легких (ЖЕЛ), функциональная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), объем форсированного выдоха за 1 секунду (ОФВ<sub>1</sub>) и соотношение ОФВ<sub>1</sub>/ЖЕЛ (индекс Тиффно). У пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы в группе получавших иммунотерапию отмечалось достоверное повышение ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub> через 7 месяцев лечения по сравнению с оценкой до иммунотерапии. Данные изменения свидетельствовали о клиническом улучшении показателей дыхания. В группе, получавших стандартное лечение, наблюдалось повышение показателя ЖЕЛ через 2 месяца после начала лечения (Табл.10).

Таблица 10. Оценка функции внешнего дыхания пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА		
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)		
	До лечен ия	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяц ев	До лечен ия	Через 2 месяца	Через 7 месяцев
ЖЕЛ (% от должного)	105 (99– 116)	110 (103– 113)	<b>115</b> <b>(103– 121) *</b>	103 (93– 109)	<b>111</b> <b>(103– 117) *</b>	112 (95– 114)	101 (99– 106)	105 (103– 114)	109,5 (105– 115)
ФЖЕЛ (% от должного)	109,5 (103– 121)	112 (108– 117)	<b>118</b> <b>(109– 122) *</b>	103 (100– 112)	110 (97– 120)	103 (95– 115)	103 (90– 106)	107 (96– 113)	110 (93– 114)
ОФВ <sub>1</sub> (% от должного)	94 (88,5– 102,5)	99 (88– 114)	<b>99,5</b> <b>(93,5– 112,5) *</b>	96 (93– 100)	99 (92– 109)	96 (95– 114)	86 (78– 97)	96 (84– 107)	92,5 (84– 105)
Индекс Тиффно (%)	91 (78– 98)	93 (86– 102)	97 (84– 102)	97 (93–99)	96 (89–98)	103 (89– 106)	91 (81– 98)	94 (84–96)	88 (86– 103)

Примечание:

\* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона. Данные приведены в виде медианы с указанием в скобках интерквартильного размаха (25–75 перцентиль).

При сравнительной оценке функции внешнего дыхания у пациентов с различными формами БА, находящихся на комбинированной терапии, определялись те же основные параметры. У пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы в группе, получавших иммунотерапию отмечалось достоверное повышение ЖЕЛ, ФЖЕЛ, ОФВ<sub>1</sub> через 7 месяцев лечения по сравнению с оценкой до иммунотерапии. Данные изменения свидетельствовали о клиническом улучшении показателей дыхания. В группе пациентов с неаллергической формой БА, получавших иммунотерапию, нет достоверно измененных показателей (Табл.10).

3.8.3 Динамика показателей по опроснику ACQ5 у групп пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Опросник ACQ5 используется как один из показателей для субъективной оценки контроля над астмой. Сумма баллов согласно ACQ5 вычисляется как среднее по 5 вопросам, чем выше балл, тем хуже. Минимальное клинически значимое различие составляет 0,5. Результаты варьируют в диапазоне от 0 до 5 баллов.

У пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы в динамике иммунотерапии отмечалось достоверное улучшение показателей контроля над астмой по опроснику ACQ5 через 7 месяцев по сравнению с началом лечения (Табл.11). Средний балл до лечения составлял 2,02, после лечения составил 1,27, разница в 0,5 балла является клинически значимой в ходе лечения. В группе получавших стандартное лечение достоверных изменений нет, у менее 30% пациентов зарегистрировано улучшение более чем на 0,5 балла через 2 месяца, и около 15% через 7 месяцев. Пациентам не увеличивался объем терапии (не переводились на лечение ступенью выше), так как отсутствовали остальные (кроме неконтролируемых симптомов) факторы риска обострений, такие как чрезмерное использование КДБА более 200 доз/месяц, низкий ОФВ1, психологические проблемы, контакт с триггерами, коморбидные состояния, беременность.

Как было указано выше, у пациентов с аллергической формой БА наблюдалось достоверное улучшение показателей по данным опросника ACQ5, что говорит об улучшении показателей контроля над астмой в данной группе. У пациентов с неаллергической формой БА в динамике иммунотерапии не отмечалось достоверного улучшения показателей контроля над астмой по опроснику ACQ5 (Табл.11).

Таблица 11. Оценка опросника ACQ5 у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Показатели	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА		
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)		
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев
ACQ5	2,01 ±0,39	1,48 ±0,3	<b>1,3</b> ± <b>0,32</b> *	2,23 ±0,48	2,26 ±0,47	2,00 ±0,65	2,26 ±0,72	1,53 ±0,73	0,93 ±0,24

Примечание:

\* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона. Данные приведены в виде среднего значения и ошибки среднего ( $M \pm SE$ ).

3.8.5 Динамика оценки качества жизни по данным опросника AQLQ(s) у групп пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Оценивались такие категории как «Активность», «Симптомы», «Эмоции», «Влияние окружающей среды», баллы от 1 до 7 имеют обратное значение, чем выше показатель, тем лучше качество жизни. Корреляция AQLQ(s) с критериями оценки тяжести БА оказывается весьма значимой. Минимальный балл - максимально негативное влияние БА на качество жизни пациента, максимальный балл - отсутствие влияния БА на качество жизни пациента.

По данным оценки опросника AQLQ(s) у группы пациентов с аллергической формой БА, получавших иммунотерапию, происходило достоверное изменение показателей в сторону улучшения к окончанию лечения во всех блоках опросника («Симптомы», «Эмоциональная сфера», «Влияние окружающей среды», «Ограничение активности»). В категории «Ограничение активности» достоверное увеличение показателя отмечалось уже через 2 месяца от начала лечения

(Табл.12). В группе пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы, получавших стандартное лечение достоверных изменений нет.

Таблица 12. Оценка опросника AQLQ(s) у пациентов с аллергической и неаллергической формами БА, получавших иммунотерапию, и пациентов с аллергической формой БА, получавших стандартное лечение

Категории опросника	Аллергическая форма БА						Неаллергическая форма БА		
	Комбинированная терапия (n = 16)			Стандартное лечение (n = 7)			Комбинированная терапия (n = 7)		
	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев	До лечения	Через 2 месяца	Через 7 месяцев
Симптомы	4,84 ±0,49	5,26 ±0,39	<b>5,72</b> ±0,34 *	4,69 ±0,43	4,56 ±0,45	5,0 ±0,69	4,75 ±1,68	<b>5,18</b> ±0,72 *	5,86 ±0,26
Ограничение активности	5,35 ±0,37	<b>5,86</b> ±0,39 *	<b>5,98</b> ±0,37 *	5,45 ±0,25	5,57 ±0,33	5,48 ±0,38	5,12 ±0,67	5,47 ±0,71	5,5 ±0,37
Эмоциональная сфера	5,15 ±0,42	5,36 ±0,44	<b>5,9</b> ±0,32 *	4,94 ±0,43	5,11 ±0,49	4,95 ±0,65	3,94 ±0,81	4,53 ±0,75	4,57 ±0,79
Влияние окружающей среды	4,88 ±0,37	5,55 ±0,55	<b>5,75</b> ±0,41 *	5,25 ±0,43	4,97 ±0,41	5,75 ±0,97	4,86 ±0,86	4,75 ±0,88	5,05 ±0,78

Примечание:

\* - достоверные отличия по сравнению с показателями до терапии,  $p < 0,05$ , критерий Вилкоксона. Данные приведены в виде среднего значения и ошибки среднего ( $M \pm SE$ ).

По данным оценки опросника AQLQ(s) у группы пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы, получавших иммунотерапию, происходило достоверное изменение показателей в сторону улучшения к окончанию лечения во всех блоках опросника. Такие категории как «Симптомы», «Эмоциональная сфера» «Влияние окружающей среды» через 7 месяцев от начала лечения. В категории «Ограничение активности» достоверное увеличение показателя отмечалось уже через 2 месяца от начала лечения.

У группы пациентов с неаллергической формой бронхиальной астмы в динамике иммунотерапии достоверные изменения отмечались в категории

«Симптомы» через 2 месяца от начала терапии, что могло свидетельствовать о субъективном клиническом улучшении и у пациентов с неаллергической формой (Табл.12).

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Большинство пациентов, страдающих БА, хорошо отвечают на традиционную терапию, однако, существенная часть больных (20–30%) рефрактерны к стандартной терапии [8], что может быть связано с низкой приверженностью к терапии, невозможностью исключения контакта с аллергенами, с вредными привычками и другими факторами. Недостаточная эффективность стандартных протоколов лечения больных бронхиальной астмой послужила основанием для поиска новых направлений системной терапии данного заболевания. Выявленное в многочисленных исследованиях изменение функциональной активности регуляторных клеток при аллергических заболеваниях, играющих важную роль в подавлении патологического Th2-ответа [145], привело к идее восстановления субпопуляции этих клеток. Ранее индукция регуляторных клеток при аллергических заболеваниях была показана в результате антиген-специфической иммунотерапии аллергенами, имеющей высокую клиническую эффективность [146]. Однако при средних и тяжелых формах БА этот метод лечения практически не применяется в связи с рисками осложнений. Открытие антиэрготипических регуляторных клеток и антиэрготипического ответа, в процессе изучения эффективности антиген-специфической Т-клеточной вакцинации [147], расширило возможности использования клеточной терапии. Эффективное использование неспецифически активированных Т-клеток или эрготопов для подавления аутоиммунной патологии и в лечении атопического дерматита посредством повышения антиэрготипического ответа послужило основанием для оценки применения данного метода иммунотерапии при бронхиальной астме.

Основным преимуществом клеточной иммунотерапии можно назвать ее безопасность, отсутствие системных побочных эффектов, так как пациенту вводятся его собственные клетки, которые способны индуцировать механизмы регуляции активированных клеток в организме. В данной работе показана безопасность и хорошая переносимость Т-клеточной иммунотерапии при бронхиальной астме, как ранее была показана безопасность данного подхода при

атопическом дерматите [15]. Иммуноterapia у пациентов с астмой не сопровождалась развитием системных побочных реакций, обострениями основного заболевания, лишь в единичных случаях фиксировались местные побочные реакции в виде покраснения, припухлости, болезненности в месте введения клеток.

В качестве активаторов Т-клеток использовали очищенные моноклональные антитела к CD3 и человеческий рекомбинантный IL-2. Количество CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в культуре достоверно возросло почти в 2 раза по сравнению с количеством CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов до культивирования, что может означать большую реактивность CD8<sup>+</sup> лимфоцитов на активацию. Для Т-клеток пациентов с БА, предназначенных для введения, после стимуляции *ex vivo* наблюдалось увеличение экспрессии эрготоп-ассоциированных маркеров ранней и поздней активации CD25, HLA-DR на CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитах, что отражает активацию Т-клеток. В исследованиях на Т-клетках здоровых доноров было показано, что активация анти-CD3 антителами и IL-2 мононуклеарных клеток в культуре приводит к увеличению экспрессии эрготоп-ассоциированных маркеров на Т-лимфоцитах [11]. Активированные таким способом клетки обладают необходимыми молекулами для индукции антиэрготипической реакции при введении в организм, что, учитывая особенность механизма действия антиэрготипического ответа, может способствовать контролю аллергического воспаления при БА.

При иммунотерапии увеличивался уровень Т-лимфоцитов периферической крови, при этом уровень НК клеток достоверно не изменялся, но отмечена тенденция к снижению, данные изменения могут быть связаны с активацией клеточного иммунного ответа. У пациентов с аллергической формой БА при стандартной терапии количественное снижение Т-лимфоцитов и достоверное увеличение НК-клеток показывало активацию системы врожденного иммунитета, что свидетельствовало о дисбалансе Т-клеточного ответа и врожденного иммунитета, в то время как иммуноterapia оказывала более корригирующее действие. Увеличение относительного количества Т-лимфоцитов связано с

применением иммунотерапии на основе аутологичных активированных клеток, а не с базисной терапией, на которой находились пациенты обеих групп в течение всего срока исследования, что косвенно отражало индукцию антиэрготопического ответа.

У пациентов с аллергической формой БА в процессе иммунотерапии уровень IgA повысился через 7 месяцев от начала лечения, данные изменения могут быть связаны с активацией механизмов местных факторов естественной защиты. Данные изменения могут быть связаны с переключением антител с IgE на IgA и активацией местных факторов естественной защиты, так как в секретах слизистых оболочек концентрация IgA максимальна. IgA выполняет функцию специфической локальной защиты и, преимущественно, нейтрализации вирусных и бактериальных патогенов. В группе с неаллергической формой БА в процессе иммунотерапии также увеличивался уровень IgA, но не отмечалось достоверности.

Результаты многочисленных эпидемиологических, экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о центральной роли IgE в формировании реактивной гиперчувствительности в ответ на воздействие аллергенов, что обуславливает целесообразность и эффективность стратегии терапии БА, направленных на модуляцию IgE-ответа. Выраженность клинических проявлений аллергии может зависеть от количественного показателя аллерген-специфических IgE. Как известно, IgE — основной участник 1 типа гиперчувствительности, по механизму которого протекают аллергические реакции, в том числе при бронхиальной астме. Уменьшение уровня IgE у пациентов с аллергической БА в ходе проведения иммунотерапии аутологичными активированными Т-клетками свидетельствовало о положительном влиянии данного подхода на IgE-опосредованные реакции, как одного из ключевых механизмов при аллергической БА [148]. В нашем исследовании также проводилась оценка количества фагоцитирующих гранулоцитов и моноцитов. У пациентов с аллергической формой БА в динамике иммунотерапии через 7 месяцев отмечалось повышение количества фагоцитирующих клеток, и в том

числе достоверно повышалось количество фагоцитирующих гранулоцитов по сравнению с показателями до лечения, что свидетельствовало о корригирующем действии проводимой иммунотерапии на показатели фагоцитарной функции.

Нами проведена оценка фенотипических особенностей Т-клеток при терапии аутологичными активированными Т-клетками, таких как уровень экспрессии HLA-DR, CD25 и PD-1 на хелперных и цитотоксических Т-лимфоцитах. Молекула CD25 является ранним маркером активации, экспрессируется в том числе на активированных Т-клетках, HLA-DR маркер поздней активации. Молекула PD-1 также участвует в регуляции Т-клеточной активации.

Treg при активации подавляют способность к пролиферации иммунокомпетентных клеток. Роль CD4<sup>+</sup> Treg в иммунных реакциях хорошо известна. Совсем недавно была исследована роль CD8<sup>+</sup> регуляторных Т-клеток (CD8<sup>+</sup>Treg) в регуляции иммунных реакций в норме и при аутоиммунных заболеваниях [149]. Различные подгруппы CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов не только проявляют цитотоксические эффекты, но и выполняют важную регуляторную роль в иммунном ответе организма. В частности, регуляторные CD8<sup>+</sup> Т-клетки (CD8<sup>+</sup>Treg), обладающие важными иммуносупрессивными функциями, способны эффективно блокировать чрезмерно реагирующий иммунный ответ и поддерживать иммунный гомеостаз организма [149]. В настоящее время используются различные маркеры для идентификации Treg, как правило, применяют маркеры CD25, CD127 и FOXP3, некоторые из них могут использоваться в качестве предпочтительных маркеров для CD8<sup>+</sup>Treg [150].

Регуляторные эффекты CD8<sup>+</sup>Treg были изучены в отношении влияния на функции Т-лимфоцитов. В последние годы в результате исследований был выявлен небольшой набор специальных CD8<sup>+</sup>Treg, которые могут распознавать молекулы основного комплекса гистосовместимости класса Ib (неклассическую молекулу MHC I, HLA-E у людей), и действовать против аутореактивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, также CD8<sup>+</sup>Treg регулируют В-клеточный ответ, ингибируют пролиферацию В-клеток и выработку иммуноглобулина [151].

У пациентов с аллергической формой БА на иммунотерапии уровень регуляторных Т-клеток весь период наблюдения сохранялся на одном уровне с донорами. При стандартном лечении до терапии и через 2 месяца уровень Трег достоверно выше, чем у пациентов на иммунотерапии, через 7 месяцев снижался до уровня здоровых доноров. Данный факт об отсутствии возрастания уровня Трег на фоне иммунотерапии мог говорить об отсутствии влияния иммунотерапии на количество Трег и в связи с этим отсутствие возрастания рисков иммуносупрессивных состояний, а также обострения хронических очагов инфекции. При сравнении воздействия иммунотерапии на различные формы БА достоверных отличий не отмечалось на всем протяжении лечения, но при неаллергической форме через 7 месяцев отмечалась тенденция к увеличению по сравнению с донорами.

При аллергической форме БА в динамике комбинированной терапии через 7 месяцев достоверно увеличивалось количество  $CD4^+$  Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации. Эти данные свидетельствовали об увеличении активированных Т-лимфоцитов у пациентов с аллергической формой астмы в динамике Т-клеточной иммунотерапии, но не аллерген-специфических, так как при сопоставлении с клинической картиной отсутствовало обострение заболевания, ухудшение состояния или снижение контролируемости астмы. Можно говорить, что увеличение уровня активированных клеток связано с индукцией антиэрготипического ответа. Также уровень активированных Т-клеток оставался повышенным и через 7 месяцев после начала терапии, так как активированные аутологичные Т-клетки вводили пациентам на протяжении всего периода исследования. Но количество  $CD8^+$  Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры ранней активации при этом через 7 месяцев снижались, что может быть характерно для активного участия активированных цитотоксических клеток в процессах цитолиза, переключения механизмов иммунного ответа, в том числе дифференцировки в другие субпопуляции (Т-клетки памяти, Трег) [64-66]. В частности, регуляторные  $CD8^+$  Т-клетки, обладающие важными иммуносупрессивными функциями, способны эффективно блокировать чрезмерно

реагирующий иммунный ответ и поддерживать иммунный гомеостаз организма. Количество CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры поздней активации, значимо не менялось.

При стандартной терапии через 7 месяцев снижалось количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих маркеры ранней активации, по сравнению с донорами и пациентами на иммунотерапии, увеличивалось количество CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих маркеры поздней активации по сравнению с донорами. У пациентов на стандартной терапии количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих PD-1 до лечения и через 2 месяца было выше по сравнению с донорами, через 7 месяцев их количество нормализовалось. У пациентов с аллергической формой БА на стандартной терапии количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих PD-1 и HLA-DR достоверно снижалось через 7 месяцев, по сравнению с показателями до лечения и через 2 месяца. Следовательно, проводимая в обеих группах стандартная терапия также влияла на активацию клеток.

У пациентов с неаллергической формой БА, получавших иммунотерапию количество CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих ранние маркеры активации, имело тенденцию ( $p=0,068$ ) к увеличению через 7 месяцев, а тенденция ( $p=0,068$ ) к повышению количества CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих поздние маркеры активации, наблюдалась через 2 и 7 месяцев от начала терапии. Количество CD4<sup>+</sup> клеток, экспрессирующих PD-1, достоверно выше до начала лечения по сравнению с донорами, и сохранялось через 2 и 7 месяцев, количество CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих PD-1, достоверно повышалось через 2 месяца, далее снижалось до нормы. Что также говорит о противовоспалительном эффекте на другие варианты локального воспаления.

В-регуляторные клетки с фенотипом CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> (Breg) играют важную роль в поддержании толерантности к аллергенам. В-регуляторные клетки 1-го типа (Br1) показали повышенную экспрессию IL-10 с антиген-специфической супрессорной способностью [84]. CD23 - низкоаффинный рецептор IgE, играет важную роль в контроле активности аллерген-специфических Т-клеток

посредством презентации аллергена В-клетками при участии IgE [88]. Поверхностная плотность CD23 на В-клетках пациентов с аллергией коррелирует с уровнями аллерген-специфического IgE и определяет связывание аллергена В-лимфоцитами и последующую активацию Т-клеток [88].

Относительное количество В1 клеток, экспрессирующих CD23, достоверно снижалось через 7 месяцев от начала лечения в группе пациентов с аллергической формой БА, получавших комбинированную терапию. Также снижалось количество CD23<sup>+</sup> В2 клеток через 7 месяцев от начала терапии у группы пациентов с аллергической формой БА, получавших иммунотерапию. Данный факт мог свидетельствовать об уменьшении количества В-клеток, экспрессирующих низкоаффинный рецептор IgE, что имеет положительный эффект при аллергической БА.

Через 7 месяцев достоверно увеличивался уровень CD3<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> клеток у пациентов с неаллергической формой по сравнению с пациентами с аллергической формой БА, также получавших иммунотерапию. Что говорит об индукции регуляторных клеток в процессе иммунотерапии у пациентов с неаллергической БА и различии в механизме действия иммунотерапии при различных формах БА.

Перфорин — один из главных цитотоксических белков в составе цитолитических гранул и один из эффекторов клеточного лизиса, осуществляемого при участии Т-лимфоцитов и естественных киллеров. Гранзимы представляют собой группу сериновых протеаз, активирующих каспазы, что приводит к гибели клеток. Перфорин и гранзим хранятся в цитозоле. Перфорин, высвобождаемый CD8<sup>+</sup> Т-клетками, собирается на мембранах-мишенях, создаёт трансмембранные каналы в мембране клетки-мишени, обеспечивая пассивную диффузию гранзима В внутрь, который затем запускает апоптоз клетки-мишени и способен неизбирательно разрушать различные типы клеток-мишеней.

*In vivo* гранзим В высвобождается после контакта с аллергеном у пациентов с астмой в сильной корреляции с IL-13. Некоторые исследования демонстрируют неожиданную пластичность гранулярного состава зрелых базофилов и

предполагает роль гранзима В как нового медиатора аллергических заболеваний [152]. Есть данные, позволяющие предположить, что гранзим В выделяется в дыхательные пути пациентов с астмой. Это предполагает роль гранзим В в патофизиологических процессах после стимуляции аллергеном, но его окончательную роль в аллергической бронхиальной астме необходимо установить [153].

Отмечалось достоверное снижение содержания гранзим В-позитивных CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с неаллергической формой БА через 7 месяцев после начала иммунотерапии. Уровень CD4<sup>+</sup>Perf<sup>+</sup>Gr<sup>+</sup>T-клеток до лечения был достоверно выше уровня доноров, через 2 и 7 месяцев снижался до уровня здоровых доноров. Возможно снижение происходило в процессе реализации цитотоксического эффекта Т-киллерными клетками. Так как механизм действия антиэрготипических Т-клеток связан с реализацией цитотоксического ответа в отношении активированных клеток, несущих эрготопы. Достоверно увеличивавшееся содержание перфорин-позитивных CD8<sup>+</sup> Т-клеток у пациентов с аллергической формой БА в динамике иммунотерапии также говорило об активации цитотоксического ответа. Увеличение количества перфорин-позитивных клеток свидетельствовало об активации цитотоксической функции, что могло говорить об активации супрессивных механизмов и подавлении активности воспалительного процесса Th1- и Th2-опосредованными типами иммунного ответа.

По данным исследований в качестве маркеров неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы могут служить: низкий уровень общего количества Т-лимфоцитов в периферической крови и клеток с фенотипом CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, гиперпродукция IgE, низкое содержание общего IgA и высокая концентрация TNF в сыворотке периферической крови [154]. В данном исследовании мы отмечаем активацию и повышение количества эффекторных молекул и клеток, участвующих в реализации функций естественных барьеров, таких как IgA, В1-клетки. На фоне иммунотерапии наблюдалась активация цитотоксического ответа и фагоцитарной функции, что способствовало

корректирующему эффекту в отношении выраженности гуморального иммунного ответа с избыточной выработкой IgE, а также подавлению активированного воспалительного клеточного ответа, со снижением действия провоспалительных цитокинов, продуцируемых Т-хелперными клетками 1 типа, 17 типа и участниками нейтрофильного воспаления.

Можно предположить, что Т-клеточная иммунотерапия оказывала корректирующее, а не подавляющее действие.

При оценке нового варианта лечения его применение должно продемонстрировать достижение и поддержание контроля и/или уменьшение обострений БА. Измерение только параметров функции легких считается недостаточным для оценки терапевтического эффекта. В качестве первичных конечных точек клинической эффективности терапии можно рассматривать показатели функции легких, данные опросников и результаты тестов для оценки контроля БА, количество обострений или снижение объема контролирующей терапии [155]. Предпочтительной конечной точкой для нового контролирующего препарата является возникновение обострения. Несмотря на то, что обострения описаны для любой степени тяжести БА, при менее тяжелой персистирующей астме может быть недостаточно их использование в качестве первичной конечной точки для этой популяции. В этом случае могут быть использованы опросники и тесты для динамики контроля симптомов БА и качества жизни пациентов. При применении препаратов, предназначенных для модификации иммунологического механизма, лежащего в основе аллергической БА, требуется некоторое время для наступления терапевтического эффекта, который оценивается не по возникновению обострения, а по другим параметрам, таким как ОФВ<sub>1</sub>, иммунологические показатели, тесты, опросники [155].

Для оценки выраженности и обратимости бронхиальной обструкции методом выбора в процессе диагностики и дальнейшего мониторинга является спирометрия. Объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ<sub>1</sub>) и функциональная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ) основные показатели, отражающие степень обструкции [156]. Для определения обратимости

бронхиальной обструкции проводят пробу с бронходилататором [157]. Общепринятым критерием положительной пробы с бронходилататором служит прирост  $ОФВ_1$  более 12% по сравнению со значением до ингаляции бронхолитического препарата [158]. Именно на функцию внешнего дыхания ориентируются в первую очередь при проведении клинических испытаний новых препаратов, а также при оценке эффективности проводимой терапии БА [159]. Применение Т-клеточной иммунотерапии у пациентов с аллергической формой БА оказывало позитивное воздействие на показатели функции легких: наблюдалось увеличение показателей  $ОФВ_1$ , ЖЕЛ, ФЖЕЛ через 7 месяцев после начала терапии. При этом положительное воздействие иммунотерапии на функциональные показатели было обнаружено при аллергической и неаллергической формах БА. Учитывая, что в группе пациентов с аллергической БА, получавших стандартное лечение, отсутствовала динамика показателей функции внешнего дыхания, полученные данные подтверждают эффективность Т-клеточной иммунотерапии при аллергической форме заболевания.

Отсутствие контроля над воспалением неуклонно ведет к прогрессированию болезни, что становится основной предпосылкой для увеличения числа тяжелых форм БА и инвалидизации пациентов. Главной клинической, социальной и этической проблемой неконтролируемого течения БА является высокая смертность среди этой категории пациентов [160, 161].

Оценка контроля симптомов БА проводится на основании клинических признаков за последние 4 недели. В сравнении с методами оценки по категориям, методики балльной оценки контроля БА более чувствительны к изменению контроля симптомов [162]. Для оценки контроля над БА используются тест по контролю над астмой (АСТ) и опросник по контролю над астмой с 5 вопросами (АСQ5) [163]. Проводилось сравнение текущего контроля астмы, определенного критериями АСQ и АСТ, с классификацией GINA у пролеченных пациентов в реальных условиях. Контроль астмы оценивался с использованием классификации GINA как «истина» и АСQ7, АСQ5 и АСТ в качестве критериев «предсказания». АСQ7 и АСТ правильно предсказали неконтролируемую астму по GINA.

Аналогичные результаты были получены с использованием ACQ5 [36]. Обнаружена статистически значимая связь между АСТ и AQLQ(s) (Asthma Quality of Life Questionnaire): увеличение АСТ на один пункт было связано с увеличением AQLQ(s) на 0,129 пункта [164].

Уровень контролируемости оценивают по изменению частоты дневных и ночных симптомов, потребности в препаратах для купирования симптомов (КДБА), ограничении активности и частоте обострений БА. Итоговая оценка баллов согласно ACQ5 вычисляется как среднее по 5 вопросам, минимальное клинически значимое различие составляет 0,5 балла [165, 166].

У пациентов с аллергической формой БА в ходе Т-клеточной иммунотерапии достоверно увеличивался уровень контроля над заболеванием. В группе пациентов с аллергической БА, получавших стандартное лечение, клинически значимых изменений (0,5 балла) не было выявлено. Данный факт не означает отсутствие эффективности стандартного лечения, набор пациентов производился по прошествии 12 недель стандартного лечения, соответственно пациенты были стабильны, несмотря на неконтролируемую форму, увеличения объема терапии не требовалось в связи с отсутствием других факторов риска обострений (чрезмерное использование КДБА, низкий ОФВ<sub>1</sub>, существенные психологические или социально-экономические проблемы, контакт с триггерами (курение, аллергены), коморбидные состояния (ожирение, риносинуситы, подтвержденная пищевая аллергия), эозинофилия мокроты или крови, беременность. У пациентов с неаллергической формой БА в динамике Т-клеточной иммунотерапии достигалось клинически значимое улучшение контроля над заболеванием (более чем в 0,5 балла [36]), но статистические различия между показателями в ходе иммунотерапии отсутствовали.

Поскольку такое заболевание, как бронхиальная астма, может оказывать влияние практически на все сферы жизни человека, то дополнительным критерием эффективности терапии служит оценка качества жизни пациентов с БА. Большинство исследователей считают, что AQLQ(s) является высоковалидным, чувствительным, надежным и воспроизводимым инструментом

оценки качества жизни исключительно больных БА. Международным консенсусом по бронхиальной астме данный опросник рекомендован для широкого применения. AQLQ(s) имеет высокие оценочные и различительные свойства [167]. В данной работе качество жизни пациентов с БА оценивали по стандартизированному опроснику AQLQ(s). AQLQ(s) способен реагировать на изменения качества жизни больных, у которых отмечаются колебания в течение БА, и отличать их от клинически стабильных пациентов [168]. В мультицентровом рандомизированном плацебо контролируемом исследовании корреляция AQLQ(s) с критериями оценки тяжести БА оказалась весьма значимой [169, 170]. Опросник классифицируется по доменам: «Симптомы», «Эмоциональная сфера», «Ограничение активности», «Влияние факторов окружающей среды». Ответы на вопросы оцениваются по шкале от 1 балла - максимально негативное влияние БА на качество жизни пациента до 7 баллов - отсутствие влияния БА на качество жизни пациента [170-172].

У пациентов с аллергической формой БА улучшение показателей по всем 4 сферам опросника AQLQ(s) наблюдалось к окончанию Т-клеточной иммунотерапии, изменения были достоверными и клинически значимыми. У группы пациентов с неаллергической формой БА в динамике иммунотерапии достоверные изменения отмечались в категории «Симптомы» через 2 месяца от начала терапии. При стандартной терапии достоверно значимых изменений не отмечалось. Данные изменения свидетельствуют о субъективном улучшении качества жизни у пациентов с аллергической и неаллергической формой БА при иммунотерапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аутологичные активированные Т-клетки практически не обладают побочными эффектами, не приводят к развитию системных нежелательных явлений, что делает иммунотерапию безопасным подходом к лечению БА.

Клетки пациентов с БА, предназначенные для введения, в процессе культивирования приобретали статус активированных клеток, экспрессирующих эрготоп-ассоциированные маркеры, что делает их способными индуцировать антиэрготипический ответ. Было выявлено положительное корректирующее влияние аутологичных активированных Т-клеток на иммунологические параметры больных с обеими формами заболевания в процессе комбинированной терапии. В группе пациентов с аллергической формой бронхиальной астмы, в ходе комбинированной терапии, наблюдалось достоверное увеличение Т-лимфоцитов, уровня IgA, а у пациентов с аллергической и неаллергической формами - увеличение количества CD4<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих маркеры ранней и поздней активации. При этом весь период наблюдения число регуляторных Т-клеток сохранялось на одном уровне. На фоне иммунотерапии происходило уменьшение количества В-клеток, экспрессирующих низкоаффинный рецептор IgE, уровня общего IgE у пациентов с аллергической формой БА, что свидетельствует о положительном влиянии иммунотерапии на IgE-опосредованные механизмы.

Показано положительное влияние иммунотерапии в сочетании со стандартной терапией на клинические параметры пациентов как с аллергической, так и с неаллергической формой БА. Применение комбинированной терапии у пациентов с аллергической формой БА оказывало положительное воздействие на показатели функции легких, увеличивался контроль над астмой, наблюдалось улучшение показателей опросника по качеству жизни AQLQ(s). У группы пациентов с неаллергической формой БА отмечалось улучшение в категории «Симптомы» опросника по качеству жизни AQLQ(s). Данные изменения свидетельствуют о субъективном клиническом улучшении у пациентов с аллергической и неаллергической формами.

Все перечисленные изменения подтверждают иммуномодулирующий эффект терапии аутологичными активированными Т-клетками и положительное влияние на течение бронхиальной астмы.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа была выполнена в рамках поискового научного исследования (рег.№ 0540-2017-0002)

## ВЫВОДЫ

1. Мононуклеарные клетки пациентов с БА, активированные *in vitro* IL-2 и анти-CD3 антителами, предназначенные для введения, характеризуются повышенным содержанием CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, CD25-экспрессирующих CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, при неизменном содержании CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т-регуляторных клеток, что свидетельствует о генерации активированных Т-клеток, экспрессирующих эрготоп-ассоциированные маркеры, при БА.

2. Иммунологические показатели пациентов с аллергической формой БА после проведения комбинированного лечения с применением активированных аутологичных Т-лимфоцитов в сочетании со стандартной терапией характеризуются увеличением относительного содержания CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, возрастанием уровня IgA и снижением IgE в сыворотке крови, усилением фагоцитарной активности гранулоцитов, что свидетельствует о корригирующем эффекте терапии.

3. Проведение комбинированного лечения с применением активированных аутологичных Т-лимфоцитов в сочетании со стандартной терапией сопровождается возрастанием относительного содержания CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD25, при отсутствии изменений в содержании CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т-регуляторных клеток, что свидетельствует об активации CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в процессе терапии.

4. Комбинированное лечение пациентов с аллергической формой БА приводит к снижению относительного содержания В-клеток, экспрессирующих CD23, что указывает на подавление IgE-опосредованных механизмов; в то время как стандартное лечение достоверно не влияет на экспрессию CD23 на В-клетках, а при неаллергической форме БА экспрессия CD23 на В-клетках не отличается от таковой у доноров.

5. Стандартная терапия у пациентов с аллергической формой БА приводит к возрастанию CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих перфорин и гранзим В, что свидетельствует об усилении цитотоксического потенциала CD8<sup>+</sup> Т-клеток;

достоверных различий между группами пациентов на комбинированной терапии и получавших только стандартное лечение не было выявлено.

6. Комбинированная терапия сопровождается повышением ОФВ<sub>1</sub>, улучшением качества жизни и показателей контроля над астмой по данным опросников у пациентов с аллергической формой БА и улучшением качества жизни пациентов с неаллергической формой БА, что свидетельствует о положительной динамике объективных и субъективных показателей эффективности терапии.

7. Применение комбинированной терапии у пациентов с аллергической формой БА приводит к уменьшению количества В-клеток, экспрессирующих низкоаффинный рецептор IgE, уровня общего IgE, увеличению Т-лимфоцитов, уровня IgA, фагоцитарной активности, оказывает положительное воздействие на показатели функции легких, что подтверждает иммуномодулирующий эффект терапии и ее положительное влияние на течение бронхиальной астмы.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АЛТР – антилейкотриеновые препараты
- АПК – антигенпрезентирующая клетка
- АСИТ – аллерген-специфическая иммунотерапия
- БА – бронхиальная астма
- БДБА – быстродействующие  $\beta_2$ -агонисты
- ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
- ГИБП – генно-инженерные биологические препараты
- ДДБА – длительнодействующие  $\beta_2$ -агонисты
- ЖЕЛ – жизненная емкость легких
- КДБА – короткодействующие  $\beta_2$ -агонисты
- КЖ – качество жизни
- ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду ( )
- ПСВ – пиковая скорость выдоха
- СГКС – системные ГКС
- ФЖЕЛ – функциональная жизненная емкость легких
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
- АСQ – опросник по контролю астмы – Asthma Control Questionnaire
- AQLQ – опросника качества жизни больных БА – Asthma Quality of Life Questionnaire
- CD – кластер дифференцировки
- CTLA-4 – антиген цитотоксических Т-лимфоцитов 4
- Foxp3 – транскрипционный фактор регуляторных клеток
- GINA – глобальная инициатива по астме
- HLA-DR – человеческие лейкоцитарные антигены МНС класса II
- H2R – гистаминовый рецептор 2 типа
- Ig – иммуноглобулин
- IgE – иммуноглобулин класса E
- ILC – innatelymphoidcells– врожденные лимфоидные клетки
- IL-2, IL-4 и др. - интерлейкин-2, интерлейкин-4 и др.

IFN, ИФН- $\gamma$  – интерферон, интерферон-гамма

LAG3 – lymphocyte-activationgene 3, мембранный белок суперсемейства иммуноглобулинов

MHC – главный комплекс гистосовместимости

NK-клетки – натуральные киллерные клетки

OX40/OX40L– или TNFSF4 – цитокин семейства факторов некроза опухоли

PD-1 – рецептор смерти-1

TCR – T-клеточный рецептор

TGF- $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор- $\beta$

TLR – toll-like рецептор

TNF – фактор некроза опухоли

Th – T-хелперы

Th0, Th1 и Th2 – субпопуляции T-хелперных клеток

Treg – регуляторные T-клетки

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Global Initiative for Asthma. // Global Strategy for Asthma Management and Prevention URL: <https://ginasthma.org/2023-gina-main-report/> (Дата обращения: 05.09.2025).
2. Khaltaev N. GARD, a new way to battle with chronic respiratory diseases, from disease oriented programmes to global partnership // J Thorac Dis. - 2017. - №9(11). - P. 4676-4689. doi: 10.21037/jtd.2017.11.91
3. Johansson S.G. et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force // Allergy. - 2001. - №56(9). - P. 813-824. doi: 10.1034/j.1398-9995.2001.t01-1-00001.x
4. Ненашева Н.М. Клинические фенотипы атопической бронхиальной астмы. Диагностика и лечение. // Saarbrucken, Germany, Palmarium Academic Publishing. - 2012. - С. 319.
5. Josefowicz S.Z., Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance // Immunity. - 2009. - №30(5). - P. 616–625. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.009
6. Gri G., Piconese S., Frossi B. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. // Immunity. - 2008. - №29(5). - P. 771-781. doi: 10.1016/j.immuni.2008.08.018
7. Shevach E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. // Immunity. - 2009. - №30(5). - P. 636-645. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.010
8. Российское респираторное общество. Федеральные клинические рекомендации. Бронхиальная астма (2021). URL: <https://spulmo.ru/obrazovatelnye-resursy/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii/> (Дата обращения: 8.09.2025).
9. Cohen I.R., Quintana F.J., Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation // J. Clin. Invest. - 2004. - №114. - P. 1227-1232. doi: 10.1172/JCI23396

10. Quintana F.J., Cohen I.R. Anti-ergotypic immunoregulation // *Scandinavian Journal of Immunology*. - 2006. - №64. - P. 205-210. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01807.x

11. Королькова О.Ю., Сенюков В.В., & Кожевников, В.С. Экспрессия эрготоп-ассоциированных маркеров активированными Т-лимфоцитами // *Медицинская иммунология*. - 2009. - №11(2-3). - С. 255-260.

12. Гойман Е.В., Кудаева О.Т., Колесникова О.П., Кожевников В.С., Ильина Н.А. Антиэрготипический ответ: влияние на иммунный ответ и развитие аутоиммунной патологии в эксперименте // *Медицинская иммунология*. - 2011. - №13 (1). - С. 29-34.

13. Mimran A., Mor F., Cohen I.R., Carmi P., Quintana F.J., Rotter V. DNA vaccination with CD 25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an anti-ergotypic response // *J. Clin. Invest.* - 2004. - №113. - P. 924-932. doi: 10.1172/JCI17772

14. Кожевников В.С., Королькова О.Ю. Антиэрготипический ответ в эксперименте и клинике. Иммунопатогенез и иммунотерапия основных заболеваний человека: от эксперимента к клинике // *Материалы 8-й отчетной конференции Научно-исследовательского института клинической иммунологии СО РАМН*. - Новосибирск: Сибмед-издат НГМУ, 2011. - С. 106-107. <https://elibrary.ru/item.asp?id=21166234>

15. Шестакова Н.А., Кожевников В.С. Влияние иммунотерапии активированными Т-лимфоцитами на параметры клеточного иммунитета больных разными формами атопического дерматита // *ActaBiomedicaScientifica*. - 2012. - №3-2. - С. 226-230. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-immunoterapii-aktivirovannymi-t-limfotsitami-na-parametry-kletochnogo-immuniteta-bolnyh-raznymi-formami-atopicheskogo>

16. C. Anandan, U. Nurmatov, O. van Schayck, A. Sheikh. Is the prevalence of asthma declining? Systematic review of epidemiological studies // *Allergy*. - 2010. - №65. - P. 152-167. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02244.x.
17. Backman H, Räisänen P, Hedman L, Stridsman C, Andersson M, Lindberg A, Lundbäck B, Rönmark E. Increased prevalence of allergic asthma from 1996 to 2006 and further to 2016-results from three population surveys // *Clin Exp Allergy*. - 2017. - №47(11). - P. 1426-1435. doi: 10.1111/cea.12963.
18. Hartl D, Koller B, Mehlhorn AT, Reinhardt D, Nicolai T, Schendel DJ, Griese M, Krauss-Etschmann S. Quantitative and functional impairment of pulmonary CD4+CD25hi regulatory T cells in pediatric asthma // *J Allergy Clin Immunol*. - 2007. - №119(5). - P. 1258-1266. doi: 10.1016/j.jaci.2007.02.023.
19. Chuchalin AG, Khaltayev N, Antonov NS, Galkin DV, Manakov LG, Antonini P, Murphy M, Solodovnikov AG, Bousquet J, Pereira MH, Demko IV. Chronic respiratory diseases and risk factors in 12 regions of the Russian Federation // *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. - 2014. - №12. - P. 963-974. doi: 10.2147/COPD.S67283
20. Батожаргалова Б.Ц., Мизерницкий Ю.Л., Подольная М.А. Метаанализ распространенности астмоподобных симптомов и бронхиальной астмы в России (по результатам программы ISAAC) // *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. - 2016. - №61(4). - С. 59-69. doi: 10.21508/1027-4065-2016-61-4-59-69
21. Murray CJ et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 // *Lancet*. - 2012. - №380(9859). - P. 2197-2223. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61689-4.
22. Бронхиальная астма // Российское респираторное общество URL: <https://spulmo.ru/obrazovatelnye-resursy/federalnye-klinicheskie-rekomendatsii/> (дата обращения: 22.11.2025).

23. O' Kane R F. Why asthma still kills // *Ulster Med J.* - 2017. - №86(1). - P. 44. PMID: 28298715; PMCID: PMC5324182.
24. Price D, Fletcher M, van der Molen T. Asthma control and management in 8,000 European patients: the Recognise Asthma and Link to Symptoms and Experience (REALISE) survey // *NPJ Prim Care Respir Med.* - 2014. - №24.- P. 14009. doi:10.1038/npjpcrm.2014.9.
25. Burney P. Death and disability due to asthma // *Global Atlas of Asthma.* European Academy of Allergy and Clinical Immunology, Zürich. – 2013. – P. 14-17.
26. Strachan D.P. Hay fever, hygiene, and household size // *BMJ.* - 1989. - №299(6710). - P. 1259–1260. doi: 10.1136/bmj.299.6710.1259
27. Laatikainen T, von Hertzen L, Koskinen JP, et al. Allergy gap between Finnish and Russian Karelia on increase // *Allergy.* - 2011. - №66(7). - P. 886-892. doi:10.1111/j.1398-9995.2010.02533.x
28. Ege MJ, Mayer M, Normand AC, et al. Exposure to environmental microorganisms and childhood asthma // *N Engl J Med.* - 2011. - №364(8). - P. 701-709. doi: 10.1056/nejmoa1007302
29. Schaub B, Liu J, Höppler S, et al. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells // *J Allergy Clin Immunol.* - 2009. - №123(4). - P. 774-782. doi: 10.1016/j.jaci.2009.01.056
30. Canova C, Torresan S, Simonato L, et al. Carbon monoxide pollution is associated with decreased lung function in asthmatic adults // *Eur Respir J.* - 2010. - №35(2). - P. 266-272. doi: 10.1183/09031936.00043709
31. Ong M.S., Umetsu D.T., Mandl K.D. Consequences of antibiotics and infections in infancy: bugs, drugs, and wheezing // *Ann Allergy Asthma Immunol.* - 2014. - №112(5). - P. 441-445. doi: 10.1016/j.anai.2014.01.022

32. Новикова В.И., Новиков П.Д., Титова Н.Д. Гетерогенность аллергии при бронхиальной астме у детей // Вестник ВГМУ. - 2014. - №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/geterogennost-allergii-pri-bronhialnoy-astme-u-detey> (дата обращения: 18.11.2025).

33. Johansson S.G., Hourihane J.O., Bousquet J. et al. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force // *Allergy*. - 2001. - №56(9). - P. 813-824. doi:10.1034/j.1398-9995.2001.t01-1-00001.x

34. Ненашева Н.М. Фенотипы бронхиальной астмы и выбор терапии // Практическая пульмонология. - 2014. - №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/fenotipy-bronhialnoy-astmy-i-vybor-terapii-1> (дата обращения: 18.09.2025).

35. Wenzel S.E. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes // *Lancet*. - 2006. - №368(9537). - P. 804-813. doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69290-8.

36. Korn S., Both J., Jung M., Hübner M., Taube C., Buhl R. Prospective evaluation of current asthma control using ACQ and ACT compared with GINA criteria // *Ann Allergy Asthma Immunol*. - 2011. - №107(6). - P. 474-479. doi: 10.1016/j.anai.2011.09.001

37. Bousquet J., Mantzouranis E. et al. Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma // *J Allergy Clin Immunol*. - 2010. - №126(5). - P. 926-938. doi: 10.1016/j.jaci.2010.07.019

38. Gibson P.G. Inflammatory phenotypes in adult asthma: clinical applications // *Clin Respir J*. - 2009. - №3(4). - P. 198-206. doi: 10.1111/j.1752-699X.2009.00162.x.

39. Асанов А.Ю., Намазова Л.С., Пинелис В.Г., Журкова Н.В., Вознесенская Н.И. Генетические основы бронхиальной астмы // Педиатрическая фармакология. - 2008. - №4. - С. 31-37. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/geneticheskie-osnovy-bronhialnoy-astmy> (дата обращения: 14.11.2025).

40. Смирнова А.Ю., Гноевых В.В., Портнова Ю.А. Генетические аспекты мультифакторных бронхообструктивных заболеваний // Ульяновский медико-биологический журнал. - 2014. № 1. - С. 8-18.
41. Meyers D., Wiesch D., Bleecker E. Genetic of asthma and bronchial hyperresponsiveness // The genetic basis of common diseases. - 2002. - P. 198-209.
42. Liang S.Q. et al. Beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) gene polymorphisms and the risk of asthma: a meta-analysis of case-control studies // PloS one. - 2014. - №9.- P. 8. e104488.
43. Woodruff P.G., Modrek B., Choy D.F., Jia G., Abbas A.R., Ellwanger A., Koth L.L., Arron J.R., Fahy J.V. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma // J Respir Crit Care Med. - 2009. - №180(5). - P. 388-395. doi: 10.1164/Rccm.200903-0392oc.
44. Locksley R. M. Asthma and allergic inflammation //Cell. – 2010. – Т. 140. – №. 6. – P. 777-783. doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.004.
45. Woodru P., Bhakta N., Fahy J. Asthma: Pathogenesis and phentotypes //Broaddus VC, Robert J., Ernst JD Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine. 6th Edn.Elsevier. – 2016. – P. 713-730.
46. Buc M. et al. Immunopathogenesis of bronchial asthma //Archivumimmunologiae et therapiaeexperimentalis. – 2009. – Т. 57. – P. 331-344.
47. Сергеева Г. Р. и др. Тяжелая бронхиальная астма: характеристика пациентов в клинической практике //Терапевтический архив. – 2015. – Т. 87. – №. 12. – С. 26-31. doi: 10.17116/ Terarkh2015871226-31.
48. Wilson C. B., Rowell E., Sekimata M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation //Nature reviews immunology. – 2009. – Т. 9. – №. 2. – P. 91-105.

49. Просекова Е.В. и др. Структурно-функциональная характеристика субпопуляции Т-хелперов 17 при аллергических заболеваниях органов дыхания у детей // *Медицинская иммунология*. – 2019. – Т. 21. – №. 6. – С. 1023-1032.

50. Koch S., Soper N., Finotto S. Th9 and other IL-9-producing cells in allergic asthma // *Seminars in immunopathology*. – Springer Berlin Heidelberg, 2017. – Т. 39. – P. 55-68. doi: 10.1007/s00281-016-0601-1

51. Zhao Y., Yang J., Gao Y.D., Guo W. Th17 immunity in patients with allergic asthma // *International archives of allergy and immunology*. - 2010. - №151(4). - P. 297-307. doi:10.1159/000250438

52. Wang Y.H, Wills-Karp M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma // *Current allergy and asthma reports*. - 2011. - №11(5). - P. 388-394. doi:10.1007/s11882-011-0210-y

53. Janssen-Heininger Y.M., Irvin C.G., Scheller E.V., Brown A.L., Kolls J.K., Alcorn J.F. Airway Hyperresponsiveness and Inflammation: Causation, Correlation, or No Relation? // *Journal of allergy & therapy*. - 2012. - №008. doi: 10.4172/2155-6121.S1-008

54. Raundhal M. et al. High IFN- $\gamma$  and low SLPI mark severe asthma in mice and humans // *The Journal of clinical investigation*. – 2015. – Т. 125. – №. 8. – P. 3037-3050. doi: 10.1172/JCI80911.

55. Josefowicz S.Z., Rudensky A. Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance // *Immunity*. – 2009. – Т. 30. – №. 5. – P. 616-625. doi: 10.1016/j.immuni.2009.04.009

56. Козлов В.А., Демина Д.В. Регуляторные клетки-супрессоры в иммунопатогенезе аллергических заболеваний // *Иммунология*. – 2017. – Т. 38. – №. 6. – С. 327-336.

57. Солдатов А.А., Авдеева Ж.И., Медуницын Н.В. Механизмы аллергической реакции немедленного типа, препараты и методы специфической

иммунотерапии //Иммунология. – 2016. – Т. 37. – №. 1. – С. 51-60. doi: 10.18821/0206-4952-2016-37-1-51-60.

58. McGee H. S., Agrawal D. K. Naturally occurring and inducible T-regulatory cells modulating immune response in allergic asthma //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2009. – Т. 180. – №. 3. – P. 211-225. doi:10.1164/rccm.200809-1505OC

59. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-лимфоцитыCD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>. Перспективы применения в иммунотерапии //Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2012. – №. 2. – С. 3-17

60. Workman C.J. et al. The development and function of regulatory T cells //Cellular and molecular life sciences. – 2009. – Т. 66.– P. 2603-2622.

61. Sojka D.K., Huang Y.H., Fowell D.J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression—a diverse arsenal for a moving target //Immunology. – 2008. – Т. 124. – №. 1. – P. 13-22. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02813.x

62. Пичужкина О.В., Гуцин И.С., Курбачева О.М. Реаранжировка иммунного ответа в результате проведения аллергенспецифической иммунотерапии //Иммунология. – 2013. – Т. 34. – №. 1. – С. 43-48.

63. Malek T.R., Castro I. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity //Immunity. – 2010. – Т. 33. – №. 2. – P. 153-165. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.004

64. Москалев А.В. и др. Т-лимфоциты-"цензорные" клетки иммунной системы //Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2019. – №. 2. – С. 191-197. doi: 10.17816/brmma25943

65. Peek E.J. et al. Interleukin-10–secreting “regulatory” T cells induced by glucocorticoids and  $\beta$ 2-agonists //American journal of respiratory cell and molecular biology. – 2005. – Т. 33. – №. 1. – P. 105-111. doi: 10.1165/rcmb.2005-0100OC

66. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции //Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7. – №. 4. – С. 347-354.
67. Xu Y.Q. et al. A defect of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in inducing interleukin-10 production from CD4<sup>+</sup> T cells under CD46 costimulation in asthma patients //Journal of Asthma. – 2010. – Т. 47. – №. 4. – P. 367-373. doi: 10.3109/02770903.2010.481340
68. Ling E.M. et al. Relation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease //The Lancet. – 2004. – Т. 363. – №. 9409. – P. 608-615. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15592-X
69. Robinson D.S. et al. Tregs and allergic disease //The Journal of clinical investigation. – 2004. – Т. 114. – №. 10. – P. 1389-1397. doi: 10.1172/JCI23595
70. Shi H.Z., Qin X.J. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in allergy and asthma //Allergy. – 2005. – Т. 60. – №. 8. – P. 986-995. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00844.x
71. van de Veen W. et al. Mechanisms of immune regulation in allergy // Global atlas of allergy. – 2014. – P. 90-91. Published by the european academy of allergy and clinical immunology
72. Cookson W.O., Moffatt M.F. Asthma--An Epidemic in the Absence of Infection? //Science. – 1997. – Т. 275. – №. 5296. – P. 41-42. doi: 10.1126/science.275.5296.41
73. Kim D.S., Drake-Lee A.B. Infection, allergy and the hygiene hypothesis: historical perspective //The Journal of Laryngology & Otology. – 2003. – Т. 117. – №. 12. – P. 946-950. doi: 10.1258/002221503322683812
74. Liu A.H., Murphy J.R. Hygiene hypothesis: fact or fiction? //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2003. – Т. 111. – №. 3. – P. 471-478. doi: 10.1067/mai.2003.172

75. Ling E.M. et al. Relation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease //The Lancet. – 2004. – T. 363. – №. 9409. – P. 608-615. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15592-X

76. Bellinghausen I. et al. Human CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production //Journal of allergy and clinical immunology. – 2003. – T. 111. – №. 4. – P. 862-868. doi: 10.1067/mai.2003.1412

77. Grindebacke H. et al. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in birch allergics during birch pollen season //Clinical & Experimental Allergy. – 2004. – T. 34. – №. 9. – P. 1364-1372. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.02067.x

78. Nguyen K.D., Vanichsarn C., Nadeau K.C. Impaired IL-10–dependent induction of tolerogenic dendritic cells by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>CD127<sup>lo/-</sup> Natural Regulatory T Cells in Human Allergic Asthma //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2009. – T. 180. – №. 9. – P. 823-833. doi: 10.1164/rccm.200905-0761OC

79. Wang L.H. et al. Insufficient increment of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells after stimulation in vitro with allergen in allergic asthma //International archives of allergy and immunology. – 2009. – T. 148. – №. 3. – P. 199-210. doi: 10.1159/000161580

80. Wei W. et al. Induction of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> T cells in HDM-allergic asthmatic children with or without SIT //International archives of allergy and immunology. – 2010. – T. 153. – №. 1. – P. 19-26. doi: 10.1159/000301575

81. Maizels R.M., Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms //Nature Reviews Immunology. – 2003. – T. 3. – №. 9. – P. 733-744. doi: 10.1038/nri1183

82. Moore K.W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor //Annual review of immunology. – 2001. – Т. 19. – №. 1. – P. 683-765. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683

83. Samitas K., Lötvall J., Bossios A. B cells: from early development to regulating allergic diseases //Archivumimmunologiae et therapiaeexperimentalis. – 2010. – Т. 58. – P. 209-225. doi:10.1007/s00005-010-0073-2.

84. Гаврилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В. Влияние Breg и IL-10 на гуморальный иммунный ответ //Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18. – №. 4. – P. 331-338. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338

85. Akdis C. A. et al. Mechanisms of immune tolerance to allergens: role of IL-10 and Tregs //The Journal of clinical investigation. – 2014. – Т. 124. – №. 11. – P. 4678-4680. doi: 10.1172/JCI78891

86. Noh J., Noh G. Allergen-Specific Responses of CD19<sup>high</sup> and CD19<sup>low</sup> B Cells in Non-IgE Mediated Food Allergy of Late Eczematous Reactions in Atopic Dermatitis: Presence of IL-17-and IL-32-Producing Regulatory B Cells (Br17 & Br32) //Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued). – 2012. – Т. 11. – №. 4. – P. 320-329. doi: 10.2174/187152812800959022

87. Noh J. et al. Allergen-specific responses of CD19 (+) CD5 (+) Foxp3 (+) regulatory B cells (Bregs) and CD4 (+) Foxp3 (+) regulatory T cell (Tregs) in immune tolerance of cow milk allergy of late eczematous reactions // Cellular immunology. – 2012. – Т. 274. – №. 1-2. – P. 109-114. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.01.005

88. Selb R. et al. CD23 surface density on B cells is associated with IgE levels and determines IgE-facilitated allergen uptake, as well as activation of allergen-specific T cells //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2017. – Т. 139. – №. 1. – P. 290-299. doi: 10.1016/j.jaci.2016.03.042

89. Балаболкин И.И., Булгакова В.А., Елисеева Т.И. Клинико-патогенетические и терапевтические аспекты коморбидности atopического дерматита и бронхиальной астмы у детей //Pedestrianized after GN Speransky. – 2021. – №. 100 (3). – С. 146–151. doi: 10.24110/0031-403X-2021-100-3-146-151
90. Montaldo E. et al. Human innate lymphoid cells //Immunology letters. – 2016. – Т. 179. – Р. 2-8. doi: 10.1016/j.imlet.2016.01.007
91. Kim H.Y., Umetsu D.T., Dekruyff R.H. Innate lymphoid cells in asthma: will they take your breath away? //European Journal of Immunology. – 2016. – Т. 46. – №. 4. – Р. 795-806. doi: 10.1002/eji.201444557
92. Абатуров А.Е., Никулина А.А. Развитие иммунного ответа при стафилококковой пневмонии (часть 7). – 2017. doi: 10.22141/2224-0551.12.8.2017.119257
93. Hepworth M.R. et al. Innate lymphoid cells regulate CD4<sup>+</sup> T-cell responses to intestinal commensal bacteria //Nature. – 2013. – Т. 498. – №. 7452. – Р. 113-117. doi: 10.1038/nature12240
94. Sokolowska M. et al. asthma. Asthma Res. Pract. – 2018. doi: 10.1186/s40733-017-0037-y
95. Spits H., Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function //Annual review of immunology. – 2012. – Т. 30. – Р. 647-675. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075053
96. Wojno E.D., Artis D. Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine //Cell host & microbe. – 2012. – Т. 12. – №. 4. – Р. 445-457. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.003
97. Астафьева Н.Г. и др. Роль микробиома дыхательных путей в респираторном здоровье //Лечащий врач. – 2019. – №. 5. – С. 88.

98. Lombardi V., Singh A.K., Akbari O. The role of costimulatory molecules in allergic disease and asthma //International archives of allergy and immunology. – 2010. – Т. 151. – №. 3. – P. 179-189.doi: 10.1159/000242355
99. Singh A.K., Stock P., Akbari O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma //Allergy. – 2011. – Т. 66. – №. 2. – P. 155-162. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02458.x
100. Утешев Д.Б. и др. Клинико-фармакологические особенности применения  $\beta$ 2-агонистов для лечения бронхиальной астмы //Медицинский совет. – 2008. – №. 11-12. – С. 24-30.
101. Cazzola M. et al.  $\beta$ 2-agonist therapy in lung disease //American journal of respiratory and critical care medicine. – 2013. – Т. 187. – №. 7. – P. 690-696. doi: 10.1164/rccm.201209-1739PP
102. Tashkin D.P. et al. Efficacy of tiotropium in COPD patients with FEV1 $\geq$  60% participating in the UPLIFT® trial //COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. – 2012. – Т. 9. – №. 3. – P. 289-296. doi: 10.3109/15412555.2012.656211
103. Архипов В.В. Клиническая фармакология антихолинергических препаратов //Практическая пульмонология. – 2014. – №. 2. – С. 32-39.
104. Ненашева Н.М. Безопасность ингаляционных глюкокортикостероидов в терапии бронхиальной астмы //Пульмонология. – 2014. – №. 3. – С. 113-120. doi:10.18093/0869-0189-2014-0-3-113-120
105. Powell H., Gibson P.G. Inhaled corticosteroid doses in asthma: an evidence-based approach //Medical journal of Australia. – 2003. – Т. 178. – №. 5. – P. 223-225. doi: 10.5694/j.1326-5377.2003.tb05167.x
106. Li Quanheng et al. Research on the curative effect of beclomethasone propionate atomization in the treatment of bronchiolitis //Chinese General Medicine. – 2017. – Т. 20. – №. 35. – P. 4438. doi: 10.3969/j.issn.1007-9572.2017.35.017

107. Авдеев С.Н. и др. Принципы выбора терапии для больных легкой бронхиальной астмой. Согласованные рекомендации РААКИ и РРО //Практическая пульмонология. – 2017. – №. 1. – С. 82-93.

108. Визель А.А. Бронхиальная астма: современные тенденции в лечении //Вестник современной клинической медицины. – 2011. – Т. 4. – №. 3. – С. 14-17.

109. Paggiaro P., Vacchi E. Montelukast in asthma: a review of its efficacy and place in therapy //Therapeutic advances in chronic disease. – 2011. – Т. 2. – №. 1. – P. 47-58. doi: 10.1177/2040622310383343

110. Корепанов А.С., Гинак А.И. Терапевтические моноклональные антитела //Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2016. – №. 36 (62). – С. 85-92.

111. Arora S., Ayyar B.V., O’Kennedy R. Affinity chromatography for antibody purification //Protein Downstream Processing: Design, Development and Application of High and Low-Resolution Methods. – 2014. – P. 497-516.

112. Corren J. et al. Efficacy and safety of omalizumab in children and adolescents with moderate-to-severe asthma: a systematic literature review //Allergy and Asthma Proceedings. – OceanSide Publications, Inc, 2017. – Т. 38. – №. 4. – P. 250-263. doi: 10.2500/aap.2017.38.4067

113. Ortega H.G. et al. Mepolizumab treatment in patients with severe eosinophilic asthma //New England Journal of Medicine. – 2014. – Т. 371. – №. 13. – P. 1198-1207. doi: 10.1056/NEJMoa1403290

114. Lugogo N. et al. Long-term efficacy and safety of mepolizumab in patients with severe eosinophilic asthma: a multi-center, open-label, phase IIIb study //Clinical therapeutics. – 2016. – Т. 38. – №. 9. – P. 2058-2070. e1. Doi: 10.1016/j.clinthera.2016.07.010

115. Bel E.H. et al. Oral glucocorticoid-sparing effect of mepolizumab in eosinophilic asthma //New England journal of medicine. – 2014. – T. 371. – №. 13. – P. 1189-1197. doi: 10.1056/NEJMoa1403291

116. Castro M. et al. Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil counts: results from two multicentre, parallel, double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trials //The Lancet Respiratory Medicine. – 2015. – T. 3. – №. 5. – P. 355-366. doi: 10.1016/S2213-2600(15)00042-9

117. Bjermer L. et al. Reslizumab for inadequately controlled asthma with elevated blood eosinophil levels: a randomized phase 3 study //Chest. – 2016. – T. 150. – №. 4. – P. 789-798. doi: 10.1016/j.chest.2016.03.032

118. Lombardi V., Akbari O. Dendritic cell modulation as a new interventional approach for the treatment of asthma //Drug news & perspectives. – 2009. – T. 22. – №. 8. – P. 445-451.

119. Bleeker E. R. et al. Efficacy and safety of benralizumab for patients with severe asthma uncontrolled with high-dosage inhaled corticosteroids and long-acting  $\beta$ 2-agonists (SIROCCO): a randomised, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial //The Lancet. – 2016. – T. 388. – №. 10056. – P. 2115-2127. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31324-1

120. FitzGerald J.M. et al. Benralizumab, an anti-interleukin-5 receptor  $\alpha$  monoclonal antibody, as add-on treatment for patients with severe, uncontrolled, eosinophilic asthma (CALIMA): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial //The Lancet. – 2016. – T. 388. – №. 10056. – P. 2128-2141. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31322-8

121. Wenzel S. et al. Dupilumab efficacy and safety in adults with uncontrolled persistent asthma despite use of medium-to-high-dose inhaled corticosteroids plus a long-acting  $\beta$ 2 agonist: a randomised double-blind placebo-controlled pivotal phase 2b dose-ranging trial //The Lancet. – 2016. – T. 388. – №. 10039. – P. 31-44. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30307-5

122. Domingo C. Overlapping effects of new monoclonal antibodies for severe asthma //Drugs. – 2017. – T. 77. – №. 16. – P. 1769-1787. doi: 10.1007/s40265-017-0810-5
123. Jutel M. et al. International consensus on allergy immunotherapy //Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2015. – T. 136. – №. 3. – P. 556-568. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.047
124. Pitsios C. et al. Contraindications to immunotherapy: a global approach //Clinical and Translational Allergy. – 2019. – T. 9. – №. 1. – P. 1-10. doi:10.1186/s13601-019-0285-4
125. Nandakumar S., Miller C.W. T., Kumaraguru U. T regulatory cells: an overview and intervention techniques to modulate allergy outcome //Clinical and Molecular Allergy. – 2009. – T. 7. – P. 1-8. doi: 10.1186/1476-7961-7-5
126. Sennikov S.V. et al. Modern strategies and capabilities for activation of the immune response against tumor cells //Tumor Biology. – 2017. – T. 39. – №. 5. – P. doi: 10.1177/1010428317698380.
127. Zhang L., Yu J., Wei W. Advance in targeted immunotherapy for graft-versus-host disease //Frontiers in immunology. – 2018. – T. 9.– P. 1087. doi: 10.3389/fimmu.2018.01087.
128. Liu M., Han Z.C. Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy //Journal of cellular and molecular medicine. – 2008. – T. 12. – №. 4. – P. 1155-1168. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00288.x.
129. Derecki N.C., Quinlan K.M., Kipnis J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice //Brain, behavior, and immunity. – 2011. – T. 25. – №. 3. – P. 379-385. doi: 10.1016/j.bbi.2010.11.009.
130. Chernykh E. et al. Monocyte-derived macrophages for treatment of cerebral palsy: a study of 57 cases //Journal of Neurorestoratology. – 2018. – T. 6. – №. 1. – P. 6. doi: 10.2147/jn.s158843.

131. Barhoumi T. et al. T Regulatory lymphocytes prevent angiotensin ii–induced hypertension and vascular injury //Hypertension. – 2011. – Т. 57. – №. 3. – P. 469-476. doi: 10.1161/hypertensionaha.110.162941.
132. Sicard A., Boardman D.A., Levings M.K. Taking regulatory T-cell therapy one step further //Current opinion in organ transplantation. – 2018. – Т. 23. – №. 5. – P. 509-515. doi: 10.1097/MOT.0000000000000566
133. Seledtsova G.V. et al. Immune responses to polyclonal T-cell vaccination in patients with progressive multiple sclerosis //Journal of immunotoxicology. – 2016. – Т. 13. – №. 6. – P. 879-884. doi: 10.1080/1547691X.2016.1223767
134. Wu Y. et al. Anti-idiotypic regulatory responses induced by vaccination with DNA encoding murine TCR Valpha5 and Vbeta2 //Cell. Mol. Immunol. – 2007. – Т. 4. – №. 4. – P. 287-293.
135. Karussis D. et al. T cell vaccination benefits relapsing progressive multiple sclerosis patients: a randomized, double-blind clinical trial //PloS one. – 2012. – Т. 7. – №. 12. – P. e50478. doi: 10.1371/journal.pone.0050478.
136. Гойман Е.В. и др. Антиэрготипический ответ: влияние на иммунный ответ и развитие аутоиммунной патологии в эксперименте //Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13. – №. 1. – С. 29-34. doi: 10.15789/1563-0625-2011-1-29-34.
137. Козлов В.А. Иммунная парадигма и иммуносупрессорная доминанта в патогенезе основных заболеваний современного человека //Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18. – №. 1. – С. 7-17. doi: 10.20538/1682-0363-2019-1-7-17
138. Иванова И.П. и др. Поликлональная Т-клеточная вакцинация в лечении рассеянного склероза //Российский иммунологический журнал. – 2016. – Т. 10. – №. 4. – С. 403-412.

139. Huurman V. A. et al. Therapy with the hsp60 peptide DiaPep277™ in C-peptide positive type 1 diabetes patients //Diabetes/metabolism research and reviews. – 2007. – T. 23. – №. 4. – P. 269-275. doi: 10.1002/dmrr.691
140. Jerne N.K. Toward a network theory of immune system //Ann Immunol (Paris). – 1974. – T. 125. – №. 1. – P. 373-389.
141. Mitra-Kaushik S. et al. Idiotype and antigen-specific T cell responses in mice on immunization with antigen, antibody, and anti-idiotypic antibody //Cellular Immunology. – 2001. – T. 209. – №. 2. – P. 109-119. doi:10.1006/cimm.2001.1794
142. Coutinho P.M. et al. An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases //Journal of molecular biology. – 2003. – T. 328. – №. 2. – P. 307-317. doi:10.1016/S0022-2836(03)00307-3
143. Mehta Y.S. et al. Role of antiidiotypic antibodies on the clinical course of idiopathic thrombocytopenic purpura //Journal of Laboratory and Clinical Medicine. – 2003. – T. 142. – №. 2. – P. 113-120. doi:10.1016/S0022-2143(03)00104-5
144. Correale J., Rojany M., Weiner L. P. Human CD8<sup>+</sup> TCR- $\alpha\beta$ <sup>+</sup> and TCR- $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific CD4<sup>+</sup> T-cells by different mechanisms //Journal of neuroimmunology. – 1997. – T. 80. – №. 1-2. – P. 47-64. doi: 10.1016/S0926-9851(97)00020-7
145. Shi H.Z., Qin X.J. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in allergy and asthma //Allergy. – 2005. – T. 60. – №. 8. – P. 986-995. doi: 10.1111/j.1398-9995.2005.00844.x
146. Gardner L.M., O’Hehir R.E., Rolland J.M. High dose allergen stimulation of T cells from house dust mite-allergic subjects induces expansion of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells, apoptosis of CD4<sup>+</sup> IL-4<sup>+</sup> T cells and T cell anergy //International archives of allergy and immunology. – 2004. – T. 133. – №. 1. – P. 1-13. doi: 10.1159/000075248

147. Mimran A., Cohen I.R. Regulatory T cells in autoimmune diseases: anti-ergotypic T cells //International reviews of immunology. – 2005. – Т. 24. – №. 3-4. – P. 159-179. doi: 10.1080/08830180590934949
148. Ненашева Н.М. Значение биомаркеров в диагностике и терапии бронхиальной астмы //Практическая пульмонология. – 2017. – №. 4. – С. 3-9.
149. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-лимфоциты CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>. Перспективы применения в иммунотерапии //Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2012. – №. 2. – С. 3-17.
150. Joosten S.A. et al. Identification of a human CD8<sup>+</sup> regulatory T cell subset that mediates suppression through the chemokine CC chemokine ligand 4 //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – Т. 104. – №. 19. – P. 8029-8034. doi: 10.1073/pnas.0702257104
151. Gupta S., Su H., Agrawal S. CD8 Treg cells inhibit B-cell proliferation and immunoglobulin production //International archives of allergy and immunology. – 2020. – Т. 181. – №. 12. – P. 947-955. doi: 10.1159/000509607
152. Tschopp C.M. et al. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma //Blood. – 2006. – Т. 108. – №. 7. – P. 2290-2299. doi: 10.1182/blood-2006-03-010348
153. Bratke K. et al. Increase in granzyme B<sup>+</sup> lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma //Clinical & Experimental Immunology. – 2004. – Т. 136. – №. 3. – P. 542-548. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02468.x
154. Петрова Е.С., Горячев Д.В., Кузнецова А.Д.. Планирование программы клинических исследований препаратов для лечения бронхиальной астмы // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2021. - №1. - С. 55-69.

155. Смольникова М.В. и др. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей //Медицинская иммунология. – 2017. – Т. 19. – №. 4. – С. 453-460. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460
156. Moore V.C. Spirometry: step by step //Breathe. – 2012. – Т.8. – №.3.– P.232-240.doi: 10.1183/20734735.0021711
157. Tan W. C. et al. Worldwide patterns of bronchodilator responsiveness: results from the Burden of Obstructive Lung Disease study //Thorax. – 2012. – Т. 67. – №. 8. – P. 718-726.doi: 10.1136/thoraxjnl-2011-201445
158. Pellegrino R. et al. Interpretative strategies for lung function tests //European respiratory journal. – 2005. – Т. 26. – №. 5. – P. 948-968.
159. Miller M.R. ATS/ERS task force: standardisation of spirometry //Eur Respir J. – 2005. – Т. 26.– P. 319-338.doi: 10.1183/09031936.05.00035205.
160. Macedo P. et al. Inflammatory biomarkers in airways of patients with severe asthma compared with non-severe asthma //Clinical & Experimental Allergy. – 2009. – Т. 39. – №. 11. – P. 1668-1676.doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03319.x
161. Дробик О.С., Битеева Д.В. Неконтролируемая бронхиальная астма— варианты решения проблемы //Астма и аллергия. – 2013. – №. 4.
162. O’Byrne P.M. et al. Measuring asthma control: a comparison of three classification systems //European Respiratory Journal. – 2010. – Т. 36. – №. 2. – P. 269-276. doi: 10.1183/09031936.00124009
163. Thomas M. et al. The Asthma Control Test™ (ACT) as a predictor of GINA guideline-defined asthma control: analysis of a multinational cross-sectional survey //Primary Care Respiratory Journal. – 2009. – Т. 18. – №. 1. – P. 41-49. doi: 10.4104/pcrj.2009.00010

164. Alpaydin A. O. et al. Asthma control test and asthma quality of life questionnaire association in adults //Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology. – 2012. – P. 301-307.

165. Juniper E.F. et al. Identifying «well-controlled» and «not well-controlled» asthma using the Asthma Control Questionnaire //Respiratory medicine. – 2006. – T. 100. – №. 4. – P. 616-621. doi: 10.1016/j.rmed.2005.08.012

166. Juniper E.F. et al. Measurement properties and interpretation of three shortened versions of the asthma control questionnaire //Respiratory medicine. – 2005. – T. 99. – №. 5. – P. 553-558. doi: 10.1016/j.rmed.2004.10.008

167. Mancuso C.A., Peterson M. G., Charlson M.E. Comparing discriminative validity between a disease-specific and a general health scale in patients with moderate asthma //Journal of clinical epidemiology. – 2001. – T. 54. – №. 3. – P. 263-274. doi: 10.1016/S0895-4356(00)00307-3

168. Sanjuás C. et al. Adaptation of the Asthma Quality of Life Questionnaire to a second language preserves its critical properties: the Spanish version //Journal of clinical epidemiology. – 2001. – T. 54. – №. 2. – P. 182-189. doi: 10.1016/S0895-4356(00)00297-3

169. Van der Molen T. et al. Discriminative aspects of two generic and two asthma-specific instruments: relation with symptoms, bronchodilator use and lung function in patients with mild asthma //Quality of Life Research. – 1997. – T. 6. – P. 353-361. doi: 10.1023/A:1018483310277

170. Загидуллин Ш.З. и др. Оценка качества жизни у пациентов с обострением бронхиальной астмы //Пульмонология. – 2013. – №. 1. – С. 49-53. doi: 10.18093/0869-0189-2013-0-1-49-53.

171. Перельман Н.Л. Особенности качества жизни у больных бронхиальной астмой с гиперосмотической гиперреактивностью дыхательных путей //Бюллетень

физиологии и патологии дыхания. – 2017. – №. 63. – С. 21-26. doi: 10.12737/article\_5935f95d8a9ea1.99410501.

172. Uchmanowicz B. et al. Health-related quality of life in patients with bronchial asthma //Advances in Respiratory Medicine. – 2014. – Т. 82. – №. 4. – P. 385-391. doi: 10.5603/piar.2014.0049.