

# ВЛИЯНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ *ASPERGILLUS FUMIGATUS* НА РЕГУЛЯЦИЮ ИММУННОГО ОТВЕТА БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ



Я.И. Козлова<sup>1</sup>, Е.В. Фролова<sup>1</sup>, И.В. Кудрявцев<sup>2,3</sup>, А.Е. Учеваткина<sup>1</sup>, Л.В. Филиппова<sup>1</sup>, О.В. Аак<sup>1</sup>, А.Е. Тараскина<sup>1</sup>, А.В. Соболев<sup>1</sup>, Н.В. Васильева<sup>1</sup>, Н.Н. Клишко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербурга, Россия

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова МЗ РФ, Санкт-Петербурга, Россия

**Резюме. Введение.** Благодаря мелким размерам спор и термотолерантности, *Aspergillus fumigatus*, способны не только сенсибилизировать больных с атопией, но и колонизировать дыхательные пути, оставаясь постоянным источником аллергенов. В настоящее время роль микроскопических плесневых грибов в иммунопатогенезе бронхиальной астмы изучена недостаточно. Цель: оценить особенности регуляции иммунного ответа больных аллергическим бронхолегочным аспергиллезом (АБЛА) и бронхиальной астмой (БА) с сенсибилизацией к *A. fumigatus*. **Материалы и методы.** В исследование включили 15 больных АБЛА, 10 больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*, 16 больных БА без сенсибилизации к *A. fumigatus*. Группу контроля составили 16 условно здоровых добровольцев. Всем больным проводили клинико-функциональное обследование. Субпопуляционный состав лимфоцитов крови определяли методом проточной цитометрии. Для оценки продукции IFN $\gamma$ , IL-10 и IL-13 к образцам периферической крови добавляли аллерген *A. fumigatus*. Иммуноферментным методом определяли содержание цитокинов в супернатантах клеточных культур, а также уровни общего IgE, специфических IgE (sIgE) к *A. fumigatus*, тимус-ассоциированного регуляторного хемокина (TARC) в сыворотке крови. **Результаты.** У больных АБЛА и БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* по сравнению с больными БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* установлены значимо более высокие уровни общего IgE, sIgE к *A. fumigatus* и TARC в сыворотке крови. Анализ результатов иммунофенотипирования лимфоцитов выявил у всех больных БА значимое превышение показателей Th2 клеток памяти и T-регуляторных клеток по сравнению с группой контроля. У больных с сенсибилизацией к *A. fumigatus* количество Tfh2 было выше, а Th17.1 клеток памяти ниже по сравнению с показателями условно здоровых добровольцев. У больных АБЛА установлены значимо более высокое количество Th2 клеток памяти и содержание TARC по сравнению с больными БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*. Усиление активности Th2 клеток памяти подтверждает повышенная секреция IL-13 и IL-10 на фоне снижения выработки IFN $\gamma$  в ответ на специфическую стимуляцию клеток крови аллергеном гриба по сравнению с больными БА и группой контроля. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством Th2 клеток памяти и уровнями sIgE, IgE, TARC и отрицательная с ОФВ1. **Заключение.** Таким образом, контакт с *A. fumigatus* существенно усиливает активность Th2 клеток па-

## Адрес для переписки:

Козлова Яна Игоревна  
194291, Россия, Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, 1/28,  
НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина.  
Тел.: 8 (812) 303-51-40. Факс: 8 (812) 510-62-77.  
E-mail: kozlova510@mail.ru

## Contacts:

Yana I. Kozlova  
194291, Russian Federation, St. Petersburg, Santiago-de-Cuba str., 1/28,  
P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology.  
Phone: +7 (812) 303-51-40. Fax: +7 (812) 510-62-77.  
E-mail: kozlova510@mail.ru

## Для цитирования:

Козлова Я.И., Фролова Е.В., Кудрявцев И.В., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Тараскина А.Е., Соболев А.В., Васильева Н.В., Клишко Н.Н. Влияние микроскопических грибов *Aspergillus fumigatus* на регуляцию иммунного ответа больных бронхиальной астмой // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 6. С. 1069–1080. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1986

## Citation:

Kozlova Ya.I., Frolova E.V., Kudryavtsev I.V., Uchevatkina A.E., Filippova L.V., Aak O.V., Taraschina A.E., Sobolev A.V., Vasilyeva N.V., Klimko N.N. The influence of *Aspergillus fumigatus* micromycetes on immune response regulation in patients with asthma // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2022, vol. 12, no. 6, pp. 1069–1080. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1986

мнати у больных БА, что может приводить к тяжелому течению заболевания и формированию аллергического бронхолегочного аспергиллеза. Установленные особенности иммунного ответа диктуют необходимость персонализированного подхода к выбору терапевтической тактики у данной категории больных.

**Ключевые слова:** аллергический бронхолегочный аспергиллез, бронхиальная астма, Т-хелперы клетки памяти, хемокины, иммунный ответ, *Aspergillus fumigatus*.

## THE INFLUENCE OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* MICROMYCETES ON IMMUNE RESPONSE REGULATION IN PATIENTS WITH ASTHMA

Kozlova Ya.I.<sup>a</sup>, Frolova E.V.<sup>a</sup>, Kudryavtsev I.V.<sup>b,c</sup>, Uchevatkina A.E.<sup>a</sup>, Filippova L.V.<sup>a</sup>, Aak O.V.<sup>a</sup>, Taraskina A.E.<sup>a</sup>, Sobolev A.V.<sup>a</sup>, Vasilyeva N.V.<sup>a</sup>, Klimko N.N.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

<sup>c</sup> Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

**Abstract.** *Introduction.* *Aspergillus fumigatus* is able not only to sensitize patients with atopy, but also to colonize the respiratory tract, remaining a constant source of allergens due to the small spore size and thermal tolerance. Currently, the role of micromycetes in the immunopathogenesis of asthma has been poorly studied. The objective was to evaluate the features of the immune response regulation in patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA) or asthma with sensitization to *A. fumigatus*. *Materials and methods.* There were enrolled 15 patients with ABPA, 10 patients with asthma with sensitization to *A. fumigatus*, 16 patients with asthma without sensitization to *A. fumigatus*. The control group consisted of 16 apparently healthy volunteers. All patients underwent a clinical and functional examination. The subpopulations of blood lymphocytes were assessed by flow cytometry. The *A. fumigatus* allergen was added to peripheral blood samples to evaluate the production of IFN $\gamma$ , IL-10 and IL-13. The serum cytokine levels in cell culture supernatants, as well as total IgE, *A. fumigatus*-specific IgE (sIgE) as well as thymus and activation-regulated chemokine (TARC) level were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Results.* Significantly higher serum levels of total IgE, *A. fumigatus*-specific sIgE and TARC were found in patients with ABPA and asthma with sensitization to *A. fumigatus* compared to patients with asthma without sensitization to *A. fumigatus*. The results of lymphocyte immunophenotyping revealed significant excess of memory Th2 cells and T-regulatory cells in all patients with asthma compared to the control group. The count of Tfh2 was higher but memory Th17.1 cells were lower in patients with sensitization to *A. fumigatus* compared to those of apparently healthy volunteers. Patients with ABPA had significantly higher count of memory Th2 cells and TARC level compared to patients with asthma sensitized to *A. fumigatus*. The increased activity of memory Th2 cells is confirmed by increased secretion of IL-13 and IL-10 following along with decreased IFN $\gamma$  production in response to specific fungal allergen stimulation of blood cells compared to the patients with asthma and the control group. A positive correlation was revealed between the count of memory Th2 cells and the levels of sIgE, IgE, TARC, a negative correlation — with FEV1. *Conclusion.* Thus, exposure to *A. fumigatus* significantly enhances the activity of memory Th2 cells in patients with asthma which can lead to severe disease course and development of allergic bronchopulmonary aspergillosis. The features of the immune response identified dictate a need for a personalized approach to choose therapeutic tactics in such patients.

**Key words:** allergic bronchopulmonary aspergillosis, asthma, memory T-helper cells, chemokines, immune response, *Aspergillus fumigatus*.

## Введение

Микроскопические грибы, имеющие широкое распространение в окружающей среде, являются представителями отдельного царства живых существ, для которых характерно разнообразное влияние на организм человека. Особое внимание уделяют плесневым термотолерантным микромицетам, способным жить при температуре +37°C, таким как *A. fumigatus* [23]. Грибы рода *Aspergillus* — наиболее значимые микромицеты, которые поражают дыхательные пути. При неэффективном удалении из респираторного тракта грибковые конидии могут прорасти, образуя гифы, которые, в свою очередь, запускают каскад иммунных реакций, приводящих к широкому спектру клинических прояв-

лений — от колонизации до инвазивного аспергиллеза. У больных с хроническими полостями в легких *A. fumigatus* может стать этиологическим агентом хронического аспергиллеза легких, а у больных с атопией — участвовать в развитии микогенной сенсибилизации и аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) [31].

Аллергический бронхолегочный аспергиллез — хроническое заболевание легких, обусловленное гиперчувствительностью к грибам рода *Aspergillus*, которое является наиболее значимым проявлением аллергического аспергиллеза и встречается во всем мире. Это потенциально деструктивное заболевание на сегодняшний день недооценено клиницистами. Чаще всего АБЛА развивается у предрасположенных пациентов с бронхиальной астмой (БА) и му-

ковисцидозом, утяжеляя течение основного заболевания, приводя к развитию бронхоэктазов и дыхательной недостаточности [12, 14].

Во время как многочисленные современные исследования посвящены патогенетическим механизмам, лежащими в основе тяжелой БА, работ по оценке иммунного ответа при развитии БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* и АБЛА недостаточно [10, 18]. Исследования нарушений местных и системных иммунорегуляторных механизмов, приводящих к гиперпродукции слизи, закупорке дыхательных путей и формированию бронхоэктазов, будут способствовать выявлению АБЛА на более ранних этапах и разработке новых терапевтических стратегий. Поэтому целью исследования стала оценка особенностей регуляции иммунного ответа больных АБЛА и БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus*.

## Материалы и методы

В микологической клинике ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России провели проспективное исследование, в которое включили 41 больного БА. Контрольную группу составили 16 условно здоровых людей, сопоставимых по возрасту и полу, без аллергических заболеваний в анамнезе.

Все участники подписали добровольное информированное согласие на проведение исследования. Протокол обследования пациентов и практически здоровых людей отвечал этическим нормам Хельсинкской декларации и был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университета имени И.И. Мечникова» МЗ РФ (Протокол № 2 от 03.02.2021). Все пациенты соответствовали общим критериям включения в исследование: диагноз «БА», тяжелое/среднетяжелое течение заболевания, возраст 18 лет и старше, отсутствие острых респираторных заболеваний в течение предшествующих 4 недель. Критериями включения в контрольную группу были: отсутствие респираторной патологии, хронической инфекционной и неинфекционной патологии, гельминтной инвазии, декомпенсированных состояний, отрицательный аллергологический анамнез, неотягощенная по БА и другим аллергическим заболеваниям наследственность.

Уровни общего IgE (Полигност, Россия), специфических IgE (sIgE) (Алкор Био, Россия), тимус-ассоциированного регуляторного хемокина (thymus and activation regulated chemokine, TARC) (R&D, США) в сыворотке крови определяли с помощью иммуноферментных тест-систем в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе DxH-800 (Beckman Coulter, США). Иммунофенотипирование лим-

фоцитов периферической крови было проведено методом 6-цветного цитофлуориметрического анализа с использованием проточного цитометра Navios™ (Beckman Coulter, США). Подготовку образцов периферической крови и настройку цитофлуориметра проводили в соответствии с национальными рекомендациями [8]. Субпопуляцию Т-хелперов (Th) клеток памяти выделяли по фенотипу CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> и анализировали уровень экспрессии на них следующих хемокиновых рецепторов: CCR4, CCR6, CXCR3 и CXCR5. Окраску антителами проводили в соответствии с рекомендациями производителей. В работе использовали моноклональные антитела, конъюгированные с флуорохромами: CD4/PerCP, CD45RA/PE/Cy7, CD183(CXCR3)/AlexaFluor488, CD194(CCR4)/PE, CD196(CCR6)/PE-Dazzle™594 и CD185(CXCR5)/Alexa Fluor 647 (Biolegend, США). После внесения антител образцы тщательно перемешивали, затем инкубировали при комнатной температуре 15 мин в защищенном от света месте. По завершении инкубации вносили 500 мкл лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (Beckman Coulter, США) с добавлением фиксирующего раствора Fixative Solution IOTest 3 (12,5 мкл) (Beckman Coulter, США). Через 10 мин инкубации при комнатной температуре в темноте образцы отмывали в 4 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) 5 мин при 1500 об/мин, удаляли надосадок и восстанавливали лейкоцитарную взвесь в 400 мкл ФСБ. При цитометрическом анализе для каждого из образцов набирали не менее 5000 лимфоцитов. Полученные результаты анализировали при помощи программного обеспечения Navios™ Software v1.2 (Beckman Coulter, США) и выражали в виде процента позитивных клеток от искомой популяции. Оценку Т-регуляторных лимфоцитов (Treg) проводили методом проточной цитометрии при окрашивании лимфоцитов периферической крови моноклональными антителами CD4/FITC, CD127/PC7 и CD25/PE (Beckman Coulter, США). Подготовку проб осуществляли в тех же условиях, что и при 6-цветном анализе.

С целью изучения антиген-специфической продукции IFN $\gamma$ , IL-10 и IL-13 к 100 мкл разведенной в 5 раз крови добавляли 100 мкл аллергена *A. fumigatus* (Алкор Био, Россия) в конечной концентрации 10 мкг/мл. Для разведения крови и аллергена использовали полную питательную среду (ППС): среда RPMI 1640 с добавлением L-глутамин (Биолот, Россия), 200 мкг/мл гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Биолот, Россия). В предварительных экспериментах были определены оптимальная доза аллергена и сроки культивирования клеток. Для спонтанной продукции цитокинов в лунки 96-луночного планшета вносились по 100 мкл ППС. Через 144 ч инкубации образцов при

37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (МСО-5А Sanyo™, Япония) отбирали надосадочную жидкость, аликвотировали и хранили при –20°C до проведения анализа. Содержание цитокинов в полученных образцах определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем (Вектор-Бест, Россия и R&D, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя.

Для изучения функции внешнего дыхания использовали спирометрию методом выполнения петли «объем–поток» с компьютерной обработкой результатов исследования. Учитывали следующие показатели: объем форсированного выдоха за первую секунду (ОФВ1), форсированная жизненная емкость легких (ФЖЕЛ), индекс Тиффно. По показаниям выполняли компьютерную томографию (КТ) легких в режиме высокого разрешения.

Диагноз, степень тяжести и уровень контроля над течением БА устанавливали в соответствии с рекомендациями рабочей группы GINA (Global Initiative for Asthma, updated, 2022) [28]. При оценке контроля над симптомами БА ориентировались на жалобы, клинические проявления, данные спирометрии с проведением теста на обратимость. Также использовали опросник АСТ (Asthma Control Test), который является краткой и доступной анкетой, содержит 5 вопросов с 5-балльной оценкой ответов. Сумма 25 баллов означают полный контроль БА, 20–24 — неполный контроль, 19 баллов и меньше — указывает на отсутствие контроля. С помощью АСТ оценивали уровень контроля БА за последние 4 недели.

Для выявления микогенной сенсибилизации и аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА) использовали рекомендации рабочей

группы ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology, 2013). Критериями микогенной сенсибилизации были: положительный кожный прик-тест ( $\geq 3$  мм) и/или выявление в сыворотке крови уровня специфического IgE к грибковому аллергену, соответствующего классу 1 и выше ( $\geq 0,35$  МЕ/мл) [9].

Полученные в процессе исследования данные обрабатывали с помощью программной системы Statistica 10 (StatSoft, США). Нормальность распределения количественных данных проверяли с помощью критерия Колмогоров–Смирнова и Шапиро–Уилка. Изучаемые характеристики представляли медианами, нижним и верхним квартилями (Me (Q<sub>0,25</sub>; Q<sub>0,75</sub>)). Для оценки значимости различий использовали непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Для выявления корреляционных взаимосвязей между двумя количественными параметрами использовали непараметрический метод ранговой корреляции по Спирмену с вычислением коэффициента ранговой корреляции (r). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

На основании результатов клинко-инструментального обследования больные БА были разделены на три группы: 16 больных БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* (БА Asp–) (женщин — 80,7%), 10 больных БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus* (БА Asp+) (женщин — 77,8%), 15 больных, у которых на фоне БА сформировался АБЛА (женщин — 80,2%). Контрольную группу составили 16 здоровых добровольцев (женщин — 75,0%). Группы не различались между собой по возрасту и полу (табл. 1).

**Таблица 1. Характеристика больных бронхиальной астмой, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**

Table 1. Characteristics of patients with bronchial asthma, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)

Показатель Parameters	Группа 1 Group 1 n = 16	Группа 2 Group 2 n = 16	Группа 3 Group 3 n = 10	Группа 4 Group 4 n = 15	Достоверно значимые различия p value
	Контрольная группа Control group	БА без сенсибилизации к <i>A. fumigatus</i> BA without sensitization to <i>A. fumigatus</i>	БА с сенсибилизацией к <i>A. fumigatus</i> BA with sensitization to <i>A. fumigatus</i>	АБЛА ABPA	
Возраст, лет Age, years	41,0 (39,0–44,5)	50,0 (37,0–56,5)	46,0 (35,0–66,0)	49,0 (41,0–64,0)	
ОФВ1, % от должного FEV1, %	–	81,0 (67,0–91,1)	64,0 (56,5–81,5)	65,0 (60,0–70,0)	p <sub>2-3</sub> = 0,005 p <sub>2-4</sub> = 0,015
АСТ, баллы ACT, score	–	15,0 (10,0–19,0)	13,5 (10,5–20,0)	13,0 (12,0–14,0)	

**Примечание.** p<sub>2-3</sub> — статистическая значимость различий между группами БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* и БА с сенсибилизацией к *A. fumigatus*; p<sub>2-4</sub> — статистическая значимость различий между группами БА без сенсибилизации к *A. fumigatus* и АБЛА (U-критерий Манна–Уитни).

Note. p<sub>2-3</sub> — statistical significance of differences between BA without and with sensitization to *A. fumigatus*; p<sub>2-4</sub> — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and ABPA groups (Mann–Whitney U-test).

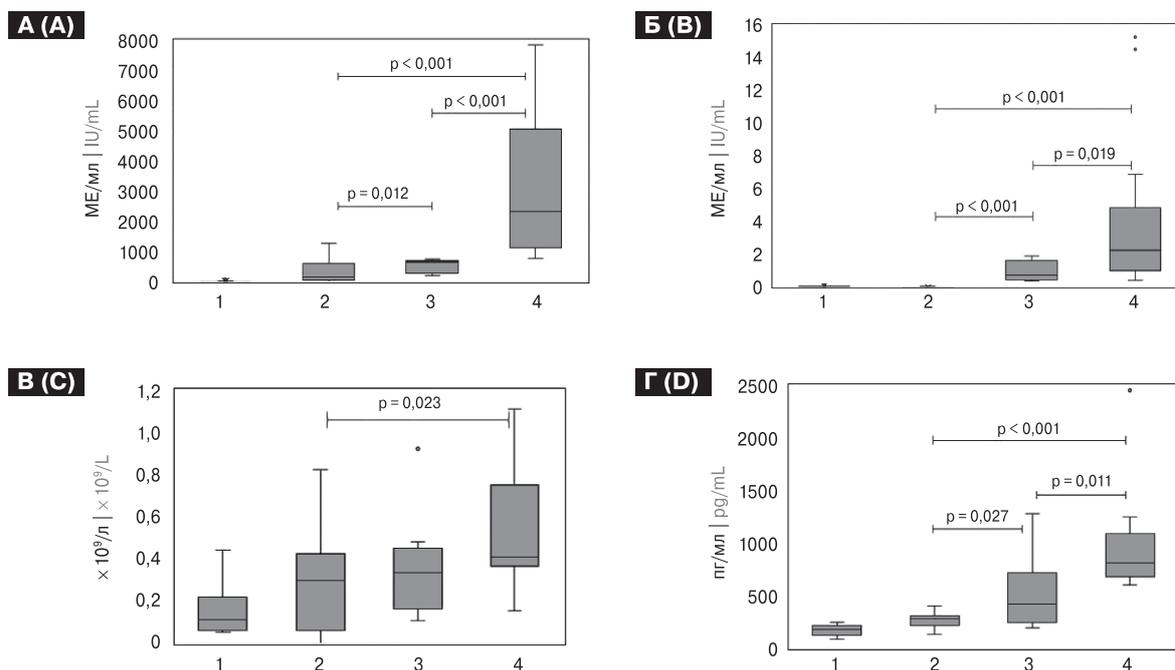
Анализ спирометрических характеристик выявил, что показатель ОФВ1 в группах больных АБЛА и БА Asp+ был значимо ниже, чем у больных БА Asp– (65,0% (60,0–70,0) и 64,0% (56,5–81,5) vs 81,0% (67,0–91,1),  $p = 0,015$  и  $p = 0,005$  соответственно), что может быть связано с более выраженным воспалением стенки бронхов, и утяжелением течения БА при сочетании с сенсibilизацией к *A. fumigatus*. Статистически значимых различий по результатам заполнения опросника АСТ у больных исследуемых групп не установлено. Однако выявлена тенденция к снижению среднего балла по мере возрастания показателей, отражающих степень сенсibilизации к *A. fumigatus* (табл. 1).

Во всех исследуемых группах больных установлено статистически значимое повышение уровня общего IgE по сравнению с группой контроля ( $p \leq 0,001$ ). Содержание общего IgE у больных АБЛА составило 2332,5 МЕ/мл (1147,0–4530,0) и было значимо выше, чем в группах больных БА Asp+ (659,0 МЕ/мл (300,0–700,0,  $p < 0,001$ ) и БА Asp– (159,0 МЕ/мл (72,0–441,0),  $p < 0,001$ ). Кроме того, данный показатель был значимо выше у больных БА Asp+ по сравнению с пациентами БА Asp– ( $p = 0,012$ ) (рис., А). Уровни sIgE

к *A. fumigatus* различались между больными АБЛА и БА Asp+ (2,23 МЕ/мл (1,10–4,14) vs 0,72 МЕ/мл (0,50–1,60),  $p = 0,019$ ) и значимо превышали показатели пациентов с БА Asp– (0,00 МЕ/мл (0,00–0,02),  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$  соответственно) (рис., В).

Известно, что эозинофилы крови могут быть маркером эозинофильного воспаления в дыхательных путях у пациентов с БА, а эозинофилия является признанным прогностическим фактором обострения заболевания. Абсолютное число эозинофилов в группе больных АБЛА составило  $0,41 \times 10^9/\text{л}$  (0,37–0,75) и было значимо выше по сравнению с показателями пациентов с БА Asp– ( $0,30 \times 10^9/\text{л}$  (0,07–0,43),  $p = 0,023$ ) и контрольной группы ( $0,09 \times 10^9/\text{л}$  (0,06–0,20),  $p < 0,001$ ). Показатели в группах больных БА Asp+ и БА Asp– не различались между собой ( $p = 0,36$ ) (рис., В).

Учитывая данные о патогенетических механизмах взаимодействия *A. fumigatus* с эпителиальными клетками дыхательных путей больных БА, в нашем исследовании был определен уровень TARC, который участвует в детерминации иммунного ответа в сторону Т2-звена [16]. Установлено существенное повышение показателей TARC во всех группах по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ). Выявлены значимые



**Рисунок. Уровни общего IgE, sIgE, TARC и количество эозинофилов в крови у больных бронхиальной астмой, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

Figure. Serum levels of total IgE, sIgE, TARC and blood eosinophil count in patients with bronchial asthma, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

**Примечание.** Показатели общего IgE (МЕ/мл) (А), sIgE (МЕ/мл) (Б), количества эозинофилов в крови ( $\times 10^9/\text{л}$ ) (В), TARC (пг/мл) (Г) у здоровых людей (группа 1), больных БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* (группа 2), больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* (группа 3) и АБЛА (группа 4).  $p$  — достоверность различий между группами (U-критерий Манна–Уитни).

Note. Serum level of total IgE (IU/ml) (A), sIgE (IU/ml) (B), count of blood eosinophils ( $\times 10^9/\text{L}$ ) (C), TARC (pg/ml) (D) in healthy subjects (group 1), BA patients without sensitization to *A. fumigatus* (group 2), BA patients with sensitization to *A. fumigatus* (group 3) and ABLA (group 4).  $p$  — significant differences between groups (Mann–Whitney U-test).

**Таблица 2. Относительное содержание субпопуляций Т-хелперов среди клеток с фенотипом CD45RA<sup>-</sup> у больных бронхиальной астмой, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)**  
 Table 2. Percentage of T-helper subpopulations out of CD45RA<sup>-</sup> cells in patients with bronchial asthma, Me (Q<sub>0,25</sub>–Q<sub>0,75</sub>)

Популяции Т-хелперов T-helper cell subsets	Содержание клеток/Cell count				Достоверно значимые различия p value
	Группа 1 Group 1 n=16	Группа 2 Group 2 n=16	Группа 3 Group 3 n=10	Группа 4 Group 4 n=15	
Контрольная группа Control group			БА с сенсibilизацией к <i>A. fumigatus</i> BA with sensitization to <i>A. fumigatus</i>	АБЛА ABPA	
Th (CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> ), %	46,0 (42,5–49,5)	49,5 (43,0–58,0)	50,0 (45,0–54,0)	48,0 (43,0–55,0)	
Th (CD45RA <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> ), %	41,75 (37,75–52,75)	53,10 (47,70–60,90)	54,30 (44,50–61,20)	49,10 (44,20–65,00)	P <sub>1-2</sub> = 0,012 P <sub>1-3</sub> = 0,013 P <sub>1-4</sub> = 0,012
Th1 (CXCR5 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>+</sup> ), %	8,35 (6,95–11,90)	9,00 (7,15–12,15)	11,90 (7,30–18,00)	8,50 (5,60–9,00)	
Th17 (CXCR5 <sup>-</sup> CCR6 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> ), %	13,35 (12,35–14,90)	14,45 (11,60–17,20)	12,45 (9,70–15,70)	13,70 (12,60–15,60)	
Th2 (CXCR5 <sup>-</sup> CCR4 <sup>+</sup> ), %	5,65 (4,30–6,30)	8,05 (5,75–10,10)	8,35 (7,40–9,80)	11,10 (8,80–13,00)	P <sub>1-2</sub> = 0,006 P <sub>1-3</sub> < 0,001 P <sub>1-4</sub> < 0,001 P <sub>2-4</sub> = 0,017 P <sub>3-4</sub> = 0,035
Th17.1 (CXCR5 <sup>-</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> ), %	14,75 (12,65–18,20)	14,65 (9,20–18,35)	8,95 (7,40–10,90)	11,10 (9,92–14,50)	P <sub>1-3</sub> = 0,001 P <sub>1-4</sub> = 0,016
Tfh1 (CXCR5 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> ), %	3,05 (2,45–4,30)	2,55 (1,60–3,10)	3,45 (2,60–3,90)	3,10 (2,10–3,50)	P <sub>1-2</sub> = 0,040 P <sub>2-3</sub> = 0,031
Tfh2 (CXCR5 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> ), %	1,95 (1,55–2,65)	1,80 (1,60–2,85)	3,15 (1,80–4,30)	2,81 (2,00–3,70)	P <sub>1-3</sub> = 0,049 P <sub>1-4</sub> = 0,011 P <sub>2-4</sub> = 0,021
Tfh17 (CXCR5 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> ), %	1,45 (1,10–2,00)	1,55 (1,20–2,00)	2,15 (1,80–2,70)	1,50 (0,70–2,40)	P <sub>1-3</sub> = 0,042
Tfh17.1 (CXCR5 <sup>+</sup> CXCR3 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> ), %	1,40 (1,10–2,10)	1,40 (1,10–2,00)	1,45 (1,30–1,80)	1,90 (1,40–2,20)	

**Примечание.** P<sub>1-2</sub> — статистическая значимость различий между группами БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* и контроле; P<sub>1-3</sub> — статистическая значимость различий между группами БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* и контроле; P<sub>1-4</sub> — статистическая значимость различий между группами АБЛА и контроле; P<sub>2-3</sub> — статистическая значимость различий между группами БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* и БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus*; P<sub>2-4</sub> — статистическая значимость различий между группами АБЛА и БА без сенсibilизации к *A. fumigatus*; P<sub>3-4</sub> — статистическая значимость различий между группами БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* и АБЛА (U-критерий Манна-Уитни).

Note. P<sub>1-2</sub> — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and control groups; P<sub>1-3</sub> — statistical significance of differences between BA with sensitization to *A. fumigatus* and control groups; P<sub>1-4</sub> — statistical significance of differences between ABPA and control groups; P<sub>2-3</sub> — statistical significance of differences between BA without vs with sensitization to *A. fumigatus*; P<sub>2-4</sub> — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and ABPA groups; P<sub>3-4</sub> — statistical significance of differences between BA with sensitization to *A. fumigatus* and ABPA groups (Mann-Whitney U-test).

различия содержания данного хемокина у больных АБЛА — 811,0 пг/мл (686,5–1039,0) по сравнению с группой БА Asp+ (425,0 пг/мл (295,0–625,0),  $p = 0,011$ ) и БА Asp– (287,0 пг/мл (238,5–310,0),  $p < 0,001$ ). Кроме того уровень TARC был значимо выше у больных БА Asp+ по отношению к пациентам БА Asp– ( $p = 0,027$ ) (рис., Г).

Важная роль TARC в прогрессировании аллергического воспаления у больных с микогенной сенсибилизацией подтверждена положительной корреляционной связью TARC с уровнем sIgE к *A. fumigatus* ( $r = 0,776$ ,  $p < 0,001$ ), общего IgE ( $r = 0,823$ ,  $p < 0,001$ ) и отрицательной с ОФВ1 ( $r = -0,552$ ,  $p < 0,001$ ).

Большое количество современных исследований посвящены иммунологическим изменениям, которые лежат в основе патогенеза различных фенотипов тяжелой БА [1, 2, 3, 7, 19]. Однако работы направленные на определение различных клонов Т-хелперов у больных с сенсибилизацией к *Aspergillus* spp. немногочисленны [10, 18]. В ходе нашего исследования мы определяли субпопуляционный состав лимфоцитов крови у пациентов с БА в зависимости от наличия сенсибилизации к *A. fumigatus* и развития АБЛА. Данные представлены в табл. 2. Значимых различий по количеству CD4<sup>+</sup> Т-хелперов между группами больных и группой контроля установлено не было. Пациенты всех групп имели достоверно более высокий процент CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Т-клеток памяти по сравнению с показателем группы контроля, что согласуется с результатами других авторов [11, 32].

Установлено, что анализ экспрессии хемокиновых рецепторов позволяет судить не только о направлении миграции CD4<sup>+</sup> Т-хелперов из кровотока, но может выступать и в качестве одного из методических приемов для определения поляризации клеток в сторону того или иного клона [6]. В нашем исследовании все CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Т-клетки памяти были разделены на CXCR5-негативные и CXCR5-позитивные. Среди CXCR5-негативных CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> Т-хелперов памяти были выявлены следующие Th с различными фенотипами: Th1 (CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>-</sup>), Th2 (CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>), «классические» Th17 (CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>) и «неклассические» Th17.1 (CXCR5<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>).

Анализ субпопуляционного состава Т-клеток памяти не выявил достоверных различий по числу Th1 и «классических» Th17 между группами, включенными в исследование (табл. 2). Установлено, что у всех групп больных БА в периферической крови относительное количество Th2 значимо превышало показатели здоровых лиц ( $p = 0,006$ ,  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$  соответственно). Содержание Th17.1 было значимо ниже в группах больных с сенсибилизацией к *A. fumigatus* по срав-

нению с контрольными показателями ( $p = 0,001$  и  $p = 0,016$  соответственно). Особенностью пациентов с АБЛА явилось значимо более высокое количество Th2 — 11,10% (8,80–13,00) по сравнению с больными БА Asp+ (8,35% (7,40–9,80),  $p = 0,035$ ) и БА Asp– (8,05% (5,75–10,10),  $p = 0,017$ ). Выявлена положительная корреляционная связь между количеством Th2 и уровнями IgE ( $r = 0,375$ ,  $p = 0,017$ ), sIgE к *A. fumigatus* ( $r = 0,339$ ,  $p = 0,030$ ), TARC ( $r = 0,577$ ,  $p = 0,001$ ) и отрицательная корреляционная связь с ОФВ1 ( $r = -0,381$ ,  $p = 0,022$ ) и числом Th17.1 ( $r = -0,335$ ,  $p = 0,032$ ).

Важной субпопуляцией Т-хелперов являются фолликулярные Т-хелперы (Tfh) — CXCR5-позитивные клетки. По аналогии с традиционными Th, среди CXCR5<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>Т-клеток памяти были выделены: Tfh1 (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>-</sup>), Tfh2 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CCR4<sup>+</sup>), Tfh17 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>-</sup>), Tfh17.1 (CXCR5<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>) [6]. Процентное содержание Tfh2 у больных обеих групп с сенсибилизацией к *A. fumigatus* было значимо выше по сравнению с контрольными значениями ( $p = 0,049$  и  $p = 0,01$  соответственно). У пациентов с АБЛА установлено более высокое число Tfh2 2,81% (2,00–3,70) по сравнению с больными БА Asp– (1,80% (1,60–2,85),  $p = 0,021$ ). Установлено снижение числа Tfh1 у больных БА Asp– по сравнению с показателями больных БА Asp+ ( $p = 0,031$ ) и контрольной группы ( $p = 0,040$ ). У больных БА Asp+ выявлено повышение количества Tfh17 по сравнению со значениями условно здоровых лиц ( $p = 0,042$ ). Значимых различий в содержании Tfh17.1 между группами, включенными в исследование, установлено не было. Выявлена положительная корреляционная связь между количеством Tfh2 и уровнями IgE ( $r = 0,383$ ,  $p = 0,015$ ), sIgE к *A. fumigatus* ( $r = 0,373$ ,  $p = 0,016$ ) и TARC ( $r = 0,380$ ,  $p = 0,021$ ).

Установлено, что относительное количество CD4<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> Treg у пациентов с АБЛА, БА Asp+ и БА Asp– достоверно превышало показатель контрольной группы (11,00% (9,10–14,00), 10,50% (7,50–12,85) и 10,20% (7,00–12,15) vs 6,7% (5,75–7,00),  $p < 0,001$ ,  $p = 0,002$  и  $p = 0,002$  соответственно). Известно, что Treg играют важную роль в поддержании иммунного гомеостаза [27]. Однако значимых различий по числу Treg между исследуемыми группами больных не выявлено.

На заключительном этапе исследования провели сравнительный анализ уровней патогенетически значимых цитокинов, продуцируемых клетками цельной крови больных БА Asp– и АБЛА в ответ на инкубацию с аллергеном *A. fumigatus*. Для анализа цитокинового профиля проводили вычисление индекса стимуляции (ИС) как соотношения индуцированной продукции цитокинов к их спонтанной выработке. Установлено, что у здоровых доноров аллерген *A. fumigatus* активировал лимфоциты к про-

дукции  $IFN\gamma$ , но не к выработке IL-10 и IL-13 (табл. 3), что согласуется с результатами других авторов [18]. В группе больных АБЛА по сравнению с группой контроля были выявлены значительно более низкие уровни  $IFN\gamma$  (15,0 пг/мл (10,0–32,0) vs 32,0 пг/мл (20,8–49,0),  $p = 0,001$ ) и значения ИС (1,00 (0,98–1,37) vs 5,76 (2,14–11,01),  $p < 0,001$ ) в ответ на индукцию грибковым аллергеном. Напротив, клетки крови больных АБЛА синтезировали более высокие уровни IL-10 (126,0 пг/мл (94,4–159,0) vs 21,2 пг/мл (10,0–36,0) и 24,5 пг/мл (22,0–32,5),  $p < 0,001$  и  $p < 0,001$  соответственно) и IL-13 (104,0 пг/мл (72,4–250,0) vs 44,5 пг/мл (42,0–56,0) и 59,0 пг/мл (38,4–59,6),  $p < 0,001$  и  $p = 0,001$  соответственно) по сравнению с показателями больных БА Asp– и здоровых лиц. Следовательно, индексы стимуляции для IL-10 (4,96 (2,95–41,83) vs 0,58 (0,25–1,55) и 1,14 (1,06–1,50),  $p = 0,001$ ,  $p = 0,001$ , соответственно) и IL-13 (3,67 (2,08–6,56) vs 0,97 (0,84–1,10) и 1,09 (0,95–1,20),  $p < 0,001$ ,  $p = 0,001$ , соответственно) значительно отличались от значений больных БА Asp– и контрольной группы.

В группе больных БА Asp– не было выявлено способности грибкового аллергена стимулировать клетки крови к выработке IL-10 и IL-13, так как показатели ИС не отличались от контрольных значений ( $p = 0,13$  и  $p = 0,09$ ) (табл. 3). Полученные данные могут свидетельствовать о выраженной активации клонов Т-лимфоцитов, специфичных к другим аэроаллергенам, но не к плесневым микромицетам, что подтверждает отсутствие у больных БА Asp– sIgE к *A. fumigatus*. Таким образом, антиген-специфическая стимуляция клеток крови больных АБЛА вызывала достоверно более высокую продукцию IL-10 и IL-13 и низкую выработку  $IFN\gamma$  по сравнению со значениями в группе контроля и БА.

## Обсуждение

Опубликованы результаты исследований, согласно которым микогенная сенсibilизация ассоциирована с тяжелым течением БА, развитием бронхоэктазов и фиброза [15, 26]. В работе Woolnough K.F. и соавт. показано, что уровень sIgE

**Таблица 3. Показатели спонтанной и антиген-стимулированной продукции цитокинов у больных бронхиальной астмой без сенсibilизации к *A. fumigatus* и АБЛА, Ме ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )**

Table 3. Parameters of spontaneous and antigen-stimulated cytokine production in patients with bronchial asthma without sensitization to *A. fumigatus* and ABPA, Me ( $Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$ )

Показатель Parameters	Группы/Groups			Достоверно значимые различия p value
	Контрольная группа Control group n = 16	БА без сенсibilизации к <i>A. fumigatus</i> BA without sensitization to <i>A. fumigatus</i> n = 16	АБЛА ABPA n = 15	
<b>IFN<math>\gamma</math> спонтанный, пг/мл</b> IFN $\gamma$ spontaneous, pg/ml	7,7 (3,45–10,35)	7,3 (5,0–19,4)	13,4 (6,0–18,8)	–
<b>IFN<math>\gamma</math> <i>A. fumigatus</i>, пг/мл</b> IFN $\gamma$ <i>A. fumigatus</i> , pg/ml	32,0 (20,8–49,0)	21,0 (16,0–32,0)	15,0 (10,0–32,0)	* $p = 0,001$
<b>ИС IFN<math>\gamma</math></b> IS IFN $\gamma$	5,76 (2,14–11,01)	1,87 (1,18–5,83)	1,00 (0,98–1,37)	* $p < 0,001$ ** $p = 0,026$ * $p = 0,049$
<b>IL-10 спонтанный, пг/мл</b> IL-10 spontaneous, pg/ml	19,5 (16,0–28,5)	23,2 (17,4–45,0)	22,0 (6,4–42,0)	–
<b>IL-10 <i>A. fumigatus</i>, пг/мл</b> IL-10 <i>A. fumigatus</i> , pg/ml	24,5 (22,0–32,5)	21,2 (10,0–36,0)	126,0 (94,4–159,0)	* $p < 0,001$ ** $p < 0,001$
<b>ИС IL-10</b> IS IL-10	1,14 (1,06–1,50)	0,58 (0,25–1,55)	4,96 (2,95–41,83)	* $p = 0,001$ ** $p = 0,001$
<b>IL-13 спонтанный, пг/мл</b> IL-13 spontaneous, pg/ml	53,0 (40,0–61,2)	52,1 (42,0–54,1)	38,2 (31,8–52,0)	–
<b>IL-13 <i>A. fumigatus</i>, пг/мл</b> IL-13 <i>A. fumigatus</i> , pg/ml	59,0 (38,4–59,6)	44,5 (42,0–56,0)	104,0 (72,4–250,0)	* $p = 0,001$ ** $p < 0,001$
<b>ИС IL-13</b> IS IL-13	1,09 (0,95–1,20)	0,97 (0,84–1,10)	3,67 (2,08–6,56)	* $p = 0,001$ ** $p < 0,001$

**Примечание.** \* $p$  — статистическая значимость различий между группой АБЛА и контролем; \*\* $p$  — статистическая значимость различий между группами АБЛА и БА без сенсibilизации к *A. fumigatus*; \* $p$  — статистическая значимость различий между группой БА без сенсibilизации к *A. fumigatus* и контролем (U-критерий Манна–Уитни).

Note. \* $p$  — statistical significance of differences between ABPA and control groups; \*\* $p$  — statistical significance of differences between ABPA and BA without sensitization to *A. fumigatus* groups; \* $p$  — statistical significance of differences between BA without sensitization to *A. fumigatus* and control groups (Mann–Whitney U-test).

к термотолерантным нитчатым грибам, в частности к *A. fumigatus*, но не уровень общего IgE, был взаимосвязан с фиксированной обструкцией воздушного потока и рядом радиологических изменений у больных БА различной степени тяжести. Авторы сделали вывод о возможном риске повреждения легких у всех больных с сенсibilизацией к *A. fumigatus* независимо от того, соответствуют ли они критериям АБЛА [33]. Сходные результаты были получены нами ранее. Показано, что сенсibilизация к *A. fumigatus*, но не к другим аэроаллергенам, существенно ухудшает течение БА [4]. В настоящем исследовании у больных с сенсibilизацией к *A. fumigatus* установлены худшие показатели ОФВ1 и результатов АСТ. Выявлена отрицательная корреляционная связь между уровнями sIgE к *A. fumigatus* и показателем ОФВ1 ( $r = -0,605$ ,  $p < 0,001$ ). Полученные данные указывают на более выраженное воспаление и возможность деструктивных изменений в легких у больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus*, что диктует необходимость дальнейшего детального изучения особенностей иммунопатогенеза микогенной аллергии.

На современном этапе известно, что иммунные реакции, возникающие в дыхательных путях при контакте с грибковыми аллергенами, вовлекают тучные клетки, базофилы, эозинофилы, врожденные лимфоидные клетки, М2-поляризованные макрофаги и Th2 [29]. Вдыхаемые грибковые аллергены поглощаются дендритными клетками (DCs). Активированные DCs мигрируют в дренирующие лимфатические узлы, где они контролируют дифференцировку CD4<sup>+</sup> Т-клеток [25]. Дифференцировка CD4<sup>+</sup> Т-клеток в Th2 зависит от TSLP, TARC/CCL17 и MCD/CCL22. Появляется все больше доказательств того, что именно TARC играет важную роль в патогенезе аллергических реакций [16]. Так установлено более высокое содержание TARC в сыворотке крови у пациентов с БА по сравнению с контрольной группой. Обращает внимание, что концентрация хемокина увеличивалась с возрастом [17]. Yormaz B. и соавт. сообщили, что сывороточные уровни TARC можно использовать в качестве биомаркеров эозинофильного фенотипа БА [35].

В соответствии с ранее опубликованными данными [5], мы выявили значимые различия уровней TARC у больных АБЛА и больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* по сравнению с показателями больных группы сравнения. Положительная корреляционная связь TARC с уровнями общего IgE, sIgE к *A. fumigatus* и отрицательная с ОФВ1 подтверждает важное значение данного хемокина в развитии аллергического воспаления у больных с микогенной сенсibilизацией и указывает на возможность его использования в дифференциальной диагностике.

После активации аллергеном Т-клетки разделяются на популяции эффекторных Т-клеток

и Т-клетки памяти, последние подразделяются на CCR7<sup>-</sup> эффекторные Т-клетки памяти (Tem) и CCR7<sup>+</sup> центральные Т-клетки памяти (Tcm) [6]. Считают, что Т-клетки памяти связаны с хроническими воспалительными заболеваниями [21, 22]. Однако конкретные субпопуляции Т-клеток памяти человека, ответственные за аллергическое воспаление при различных эндотипах БА, недостаточно хорошо охарактеризованы. Поэтому крайне важно определить, какие субпопуляции Т-клеток памяти связаны с хроническим воспалением в легких у больных с сенсibilизацией к *A. fumigatus*. Можно предположить, что Т-клетки больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* обладают уникальными фенотипами и функциями, которые могут поддерживать хроническое воспаление в нижних дыхательных путях.

В ходе исследования было выявлено значительное увеличение циркулирующих CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> Т-клеток памяти у всех больных БА по сравнению с группой контроля. Известно, что CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти могут быстро пролиферировать в ответ на повторное проникновение специфического антигена и приобретать эффекторный фенотип с секрецией цитокинов и хемокинов [24]. Следовательно, долгоживущие Т-клетки памяти, обнаруженные в крови пациентов с БА, могут играть важную роль в хроническом воспалении нижних дыхательных путей в ответ на различные аллергены. Ранее сообщалось об увеличении числа CCR4<sup>+</sup> Th2 у пациентов с БА [20, 32]. Анализ наших данных установил, что у всех пациентов, включенных в исследование, повышено число циркулирующих Th2 клеток памяти по сравнению с контрольной группой. У больных АБЛА число Th2 клеток памяти было выше, чем у больных БА с сенсibilизацией и без таковой к *A. fumigatus*. Напротив, установлено снижение числа Th17.1 у больных АБЛА и БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* по сравнению с показателями условно здоровых добровольцев.

Известно, что после активации Th2 продуцируют ряд провоспалительных цитокинов: IL-4, IL-13, IL-5 и IL-9. За пролиферацию аллерген-специфических В-клеток и переключение изотипов иммуноглобулинов на IgE класс отвечают IL-4 и IL-13. Главный цитокин Th2 — IL-13 — индуцирует метаплазию бокаловидных клеток, фиброз и гиперреактивность бронхов, и в сочетании с IL-5 способствует пролиферации и выживанию эозинофилов в дыхательных путях [16]. В нашем исследовании, усиление активности Th2 клеток памяти у пациентов с АБЛА подтверждает повышение секреции IL-13 на фоне снижения выработки IFN $\gamma$  в ответ на специфическую стимуляцию клеток крови грибковым аллергеном по сравнению с группой контроля и больными БА. Полученные данные согласуют-

ся с ранее представленными результатами в другом исследовании. Показано, что у пациентов с АБЛА наблюдалось увеличение индуцированных *Aspergillus* spp. IL-5 и IL-13 и снижение продукции IFN $\gamma$  по сравнению со здоровым контролем [10]. Установленная нами положительная корреляционная связь между количеством Th2 клеток памяти и уровнями sIgE, IgE, TARC и отрицательная с ОФВ1 подтверждает клиническую значимость данного показателя у пациентов с микогенной сенсibilизацией. Значимые различия по числу CXCR3<sup>+</sup> Th1 и «классических» CCR6<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> Th17 в крови пациентов и контрольных субъектов не были выявлены, что совпадает с результатами других авторов [32].

После активации антигеном CXCR5<sup>+</sup> В-лимфоциты мигрируют в первичные фолликулы лимфатических узлов, где происходит переключение изотипа и «созревание» аффинитета иммуноглобулинов при участии фолликулярных дендритных клеток и Tfh. Отличительной чертой Tfh является экспрессия CXCR5. Считается, что Tfh2 легко вступают в контакт с В-клетками для активации через CXCL13, лиганд CXCR5, секретируемый различными клетками, включая фолликулярные дендритные клетки, эндотелиальные клетки, а также клетки Tfh [13]. Опубликованы сведения о связи дифференцировки Th2 и Tfh2, согласно которым они вносят вклад в патогенез аллергического воспаления, опосредованного IgE [19, 30]. В последнее время появляются новые данные о том, что Tfh, а не Th2, играют решающую роль в контроле продукции IgE [34]. В нашем исследовании наибольшее число Tfh2 установлено у больных АБЛА, а также у больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* и выявлена положительная корреляционная связь между количеством Tfh2 и уровнями IgE, sIgE к *A. fumigatus* и TARC, но отсутствовала связь с показателями функции дыхания.

Известно, что CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты содержат субпопуляцию Т-регуляторных клеток, обеспечивающих аутоотолерантность к собственным

антигенам и сдерживающих чрезмерную активность клеток иммунной системы. Адаптивные регуляторные Т-хелперы образуются при иммунном ответе и служат фактором, ограничивающим иммунный ответ на его заключительных стадиях за счет действия CTLA-4 и продукции противовоспалительных цитокинов. Адаптивные Treg характеризуются экспрессией TGF- $\beta$ , IL-10 и IL-4. TGF- $\beta$  и IL-10 способствуют подавлению иммунного ответа, опосредованного функциональной активностью Th1 и Th2 [27]. В настоящем исследовании было установлено, что наиболее высокое число Treg выявлено у больных АБЛА, что согласуется с повышенной продукцией IL-10 у данной категории больных. Усиление активности Treg может отражать степень противодействия хронической воспалительной реакции, поддерживаемой грибковыми аллергенами в том случае, когда термотолерантные грибы способны длительно сохраняться в дыхательных путях [29].

## Заключение

Результаты проведенного исследования соответствуют сформированным ранее представлениям о доминировании эозинофильного воспаления, развивающегося в дыхательных путях больных БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus*. Положительная корреляционная связь числа циркулирующих Th2 и Tfh2 с активностью синтеза плазматическими клетками IgE и sIgE к *A. fumigatus*, а также уровнями TARC в сыворотке крови указывает на важную роль этих клеток в патогенезе микогенной аллергии. Учитывая все более широкое использование антицитокиновой биологической терапии у больных БА, изучение патогенетических механизмов БА с сенсibilизацией к *A. fumigatus* необходимо для дальнейшей разработки терапевтических моноклональных антител, применение которых повысит уровень контроля БА и позволит снизить объем системной стероидной терапии.

## Список литературы/References

1. Барковская М.Ш., Блинова Е.А., Гришина Л.В., Леонова М.И., Непомнящих В.М., Демина Д.В., Козлов В.А. Содержание CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> эффекторных клеток памяти и пролиферативная активность Т-лимфоцитов при бронхиальной астме // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 503–516. [Barkovskaya M.S., Blinova E.A., Grishina L.V., Leonova M.I., Nepomniashchikh V.M., Demina D.V., Kozlov V.A. Contents of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> effector memory cells and proliferative activity of T lymphocytes in bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 503–516. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-503-516
2. Бибкова А.А., Сысоев К.А., Семенов А.В., Любимова Н.С., Арсентьева Н.А., Трофимов В.И., Тотолян Арег А. Значимость определения некоторых хемокинов и их рецепторов у больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14, № 1–2. С. 109–188. [Bibkova A.A., Syssoev K.A., Semenov A.V., Lubimova N.S., Arsentieva N.A., Trofimov V.I., Totolian Areg A. Evaluation and clinical significance of chemokines and their specific receptors in patients with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 1–2, pp. 109–188. (In Russ.)]
3. Виткина Т.И., Новгородцева Т.П., Калинина Е.П., Лобанова Е.Г., Антонюк М.В. Иммунные механизмы формирования бронхиальной астмы контролируемого и частично контролируемого течения // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21, № 3. С. 495–502. [Vitkina T.I., Novgorodtseva T.P., Kalinina E.P., Lobanova E.G., Antonyuk M.V. Immune mechanisms for development of controlled and partially controlled asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 495–502. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2019-3-495-502

4. Козлова Я.И., Учеваткина А.Е., Филиппова Л.В., Аак О.В., Кузнецов В.Д., Фролова Е.В., Васильева Н.В., Клишко Н.Н. Сенсибилизация к *Aspergillus* spp. у больных бронхиальной астмой // *Врач*. 2021. Т. 32, № 5. С. 50–55. [Kozlova Y., Uchevatkina A., Filippova L., Aak O., Kuznetsov V., Frolova E., Vasilyeva N., Klimko N. Sensitization to *Aspergillus* spp. in patients with asthma. *Vrach = The Doctor*, 2021, vol. 32, no. 5, pp. 50–55. (In Russ.)] doi: 10.29296/25877305-2021-05-09
5. Козлова Я.И., Фролова Е.В., Филиппова Л.В., Учеваткина А.Е., Аак О.В., Соловьева Г.И., Клишко Н.Н. Диагностические маркеры аллергического бронхолегочного аспергиллеза у больных бронхиальной астмой // *Медицинская иммунология*. 2018. Т. 20, № 4. С. 561–570. [Kozlova Y.I., Frolova E.V., Filippova L.V., Uchevatkina A.E., Aak O.V., Solovyeva G.I., Klimko N.N. Diagnostic markers of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2018, vol. 20, no. 4, pp. 561–570. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2018-4-561-570
6. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Тотолян Арег А. Хемокиновые рецепторы на Т-хелперах различного уровня дифференцировки: основные субпопуляции // *Медицинская иммунология*. 2016. Т. 18, № 3. С. 239–250. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinec I.I., Savchenko A.A., Serebriakova M.K., Totolian A.A. Chemokine receptors at distinct differentiation stages of T-helpers from peripheral blood. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2016, vol. 18, no. 3, pp. 239–250. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-3-239-250
7. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С. Иммунологические маркеры неконтролируемого течения atopической бронхиальной астмы у детей // *Медицинская иммунология*. 2017. Т. 19, № 4. С. 453–460. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S. Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*. 2017, vol. 19, no. 4, pp. 453–460. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460
8. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // *Медицинская иммунология*. 2012. Т. 14, № 3. С. 255–268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, vol. 14, no. 3, pp. 255–268. (In Russ.)]
9. Agarwal R., Chakrabarti A., Shah A., Gupta D., Meis J.F., Guleria R., Moss R., Denning D.W. For the ABPA complicating asthma ISHAM working group 2013. Allergic bronchopulmonary aspergillosis: review of literature and proposal of new diagnostic and classification criteria. *Clin. Exp. Allergy*, 2013, vol. 43, no. 8, pp. 850–873. doi: 10.1111/cea.12141
10. Becker K.L., Gresnigt M.S., Smeekens S.P., Jacobs C.W., Magis-Escurra C., Jaeger M., Wang X., Lubbers R., Oosting M., Joosten L.A., Netea M.G., Reijers M.H., van de Veerdonk F.L. Pattern recognition pathways leading to a Th2 cytokine bias in ABPA patients. *Clin. Exp. Allergy*, 2015, vol. 45, pp. 423–437. doi: 10.1111/cea.12354
11. Campbell J.J., Brightling C.E., Symon F.A., Qin S., Murphy K.E., Hodge M., Andrew D.P., Wu L., Butcher E.C., Wardlaw A.J. Expression of chemokine receptors by lung T cells from normal and asthmatic subjects. *J. Immunol.*, 2001, vol. 166, no. 4, pp. 2842–2848. doi: 10.4049/jimmunol.166.4.2842
12. Carsin A., Romain T., Ranque S., Reynaud-Gaubert M., Dubus J.-C., Mege J.-L., Vitte J. *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis: an update on immune interactions and molecular diagnostics in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy*, 2017, vol. 11, pp. 1632–1642. doi: 10.1111/all.13204
13. Crotty S. T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity*, 2019, vol. 50, no. 5, pp. 1132–1148. doi: 10.1016/j.immuni.2019.04.011
14. Denning D.W., Pashley C., Hartl D., Wardlaw A., Godet C., Del Giacco S., Delhaes L., Sergejeva S. Fungal allergy in asthma: state of the art and research needs. *Clin. Transl. Allergy*, 2014, vol. 4, pp. 14. doi: 10.1186/2045-7022-4-14
15. Goh K., Yip A.C.A., Lapperre T., Chan A.K., Chew F.T., Chotirmall S.H., Koh M.S. Sensitization to *Aspergillus* species is associated with frequent exacerbations in severe asthma. *J. Asthma Allergy*, 2017, vol. 10, pp. 131–140. doi: 10.2147/JAA.S130459
16. Hirata H., Yukawa T., Tanaka A., Miyao T., Fukuda T., Fukushima Y., Kurasawa K., Arima M. Th2 cell differentiation from naive CD4+ T cells is enhanced by autocrine CC chemokines in atopic diseases. *Clin. Exp. Allergy*, 2019, vol. 49, no. 4, pp. 474–483. doi: 10.1111/cea.13313
17. Jo K.M., Lim H.K., Sull J.W., Choi E., Lee J.S., Cheong M.A., Hong M.H., Kim Y., Kim I.S. Thymus and activation-regulated chemokine (TARC)/CCL17 and IgE are associated with elderly asthmatics. *Immun. Ageing*, 2018, vol. 15, pp. 13. doi: 10.1186/s12979-018-0118-7
18. Jolink H., de Boer R., Willems L.N., van Dissel J.T., Falkenburg J.H., Heemskerk M.H. T helper 2 response in allergic bronchopulmonary aspergillosis is not driven by specific *Aspergillus* antigens. *Allergy*, 2015, vol. 70, no. 10, pp. 1336–1339. doi: 10.1111/all.12688
19. Kamekura R., Shigehara K., Miyajima S., Jitsukawa S., Kawata K., Yamashita K., Nagaya T., Kumagai A., Sato A., Matsumiya H., Ogasawara N., Seki N., Takano K., Kokai Y., Takahashi H., Himi T., Ichimiya S. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin. Immunol.*, 2015, vol. 158, no. 2, pp. 204–211. doi: 10.1016/j.clim.2015.02.016
20. Kurashima K., Fujimura M., Myou S., Ishiura Y., Onai N., Matsushima K. Asthma severity is associated with an increase in both blood CXCR3+ and CCR4+ T cells. *Respirology*, 2006, vol. 11, no. 2, pp. 152–157. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00822.x
21. Lloyd C.M., Hessel E.M. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, vol. 10, no. 12, pp. 838–848. doi: 10.1038/nri2870
22. Moaaz M., Youssry S., Baess A., Abed A., Moaaz M. Immune signature of CCR7+ central memory T cells associates with disease severity and Immunoglobulin E in bronchial asthma. *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.*, 2021, vol. 53, no. 3, pp. 115–127. doi: 10.23822/EurAnnACI.1764-1489.168
23. Pashley C.H., Wardlaw A.J. Allergic fungal airways disease (AFAD): an under-recognised asthma endotype. *Mycopathologia*, 2021, vol. 186, no. 5, pp. 609–622. doi: 10.1007/s11046-021-00562-0
24. Pepper M., Jenkins M.K. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2011, vol. 12, no. 6, pp. 467–471. doi: 10.1038/ni.2038
25. Ramirez-Ortiz Z.G., Means T.K. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence*, 2012, vol. 3, pp. 635–646. doi: 10.4161/viru.22295
26. Sio Y.Y., Pang S.L., Say Y.H., Teh K.F., Wong Y.R., Shah S.M.R., Reginald K., Chew F.T. Sensitization to airborne fungal allergens associates with asthma and allergic rhinitis presentation and severity in the singaporean/malaysian population. *Mycopathologia*, 2021, vol. 186, no. 5, pp. 583–588. doi: 10.1007/s11046-021-00532-6

27. Sjaastad L.E., Owen D.L., Tracy S.I., Farrar M.A. Phenotypic and functional diversity in regulatory T cells. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 2021, vol. 9: 715901. doi: 10.3389/fcell.2021.715901
28. The Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2022. URL: <https://ginasthma.org/gina-reports> (10.08.2022)
29. Tiwary M., Samarasinghe A.E. Initiation and pathogenesis of severe asthma with fungal sensitization. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 4: 913. doi: 10.3390/cells10040913
30. Varricchi G., Harker J., Borriello F., Marone G., Durham S.R., Shamji M.H. T follicular helper (T<sub>fh</sub>) cells in normal immune responses and in allergic disorders. *Allergy*, 2016, vol. 71, no. 8, pp. 1086–1094. doi: 10.1111/all.12878
31. Wardlaw A.J., Rick E.M., Pur Ozyigit L., Scadding A., Gaillard E.A., Pashley C.H. New perspectives in the diagnosis and management of allergic fungal airway disease. *J. Asthma Allergy*, 2021, vol. 14, pp. 557–573. doi: 10.2147/JAA.S251709
32. Wiest M., Upchurch K., Yin W., Ellis J., Xue Y., Lanier B., Millard M., Joo H., Oh S. Clinical implications of CD4<sup>+</sup> T cell subsets in adult atopic asthma patients. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2018, vol. 14: 7. doi: 10.1186/s13223-018-0231-3
33. Woolnough K.F., Richardson M., Newby C., Craner M., Bourne M., Monteiro W., Siddiqui S., Bradding P., Pashley C.H., Wardlaw A.J. The relationship between biomarkers of fungal allergy and lung damage in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2017, vol. 47, no. 1, pp. 48–56. doi: 10.1111/cea.12848
34. Yao Y., Chen C.L., Yu D., Liu Z. Roles of follicular helper and regulatory T cells in allergic diseases and allergen immunotherapy. *Allergy*, 2021, vol. 76, no. 2, pp. 456–470. doi: 10.1111/all.14639
35. Yormaz B., Menevse E., Cetin N., Esin Celik Z., Bakir H., Tulek B., Korez M.K., Suerdem M. Diagnostic value of thymus and activation-regulated chemokine and of periostin in eosinophilic asthma: a prospective study. *Allergy Asthma Proc.*, 2021, vol. 42, no. 1, pp. e30–e39. doi: 10.2500/aap.2021.42.200102

**Авторы:**

**Козлова Я.И.**, к.м.н., доцент кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Фролова Е.В.**, к.м.н., зав. НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Кудрявцев И.В.**, к.б.н., зав. лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия;

**Учеваткина А.Е.**, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Филиппова Л.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Аак О.В.**, к.х.н., ведущий научный сотрудник НИЛ иммунологии и аллергологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Тараскина А.Е.**, к.б.н., зав. НИЛ молекулярно-генетической микробиологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Соболев А.В.**, д.м.н., профессор кафедры клинической микологии, аллергологии и иммунологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Васильева Н.В.**, д.б.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия;

**Климко Н.Н.**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Kozlova Ya.I.**, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Frolova E.V.**, PhD (Medicine), Head of the Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Kudryavtsev I.V.**, PhD (Biology), Head of the Cell Immunology Laboratory, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Assistant Professor, Department of Immunology, Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation;

**Uchevatkina A.E.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Filippova L.V.**, PhD (Medicine), Senior Researcher, Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Aak O.V.**, PhD (Chemistry), Leading Researcher, Research Laboratory of Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Taraskina A.E.**, PhD (Biology), Head of the Research Laboratory of Molecular Genetic Microbiology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Sobolev A.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Vasilyeva N.V.**, PhD, MD (Biology), Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Director, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation;

**Klimko N.N.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Clinical Mycology, Allergology and Immunology, P.N. Kashkin Research Institute of Medical Mycology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.