

А.Д. Перцева¹, Н.З. Зокиров², В.В. Трошина¹, Л.С. Намазова-Баранова^{1, 3, 4}, С.Ю. Тараканова²

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздрава России, Москва

² Центральная детская клиническая больница ФМБА России, Москва

³ Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Российская Федерация

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава
Российской Федерации

Изучение естественных регуляторных Т клеток и их молекулярного маркера FOXP3 у часто болеющих детей дошкольного возраста, проживающих в условиях антропогенной нагрузки

Контактная информация:

Перцева Анна Дмитриевна, ассистент кафедры факультетской педиатрии № 1 педиатрического факультета ГБОУ ВПО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1, тел.: (916) 543-18-31, e-mail: pertseva_anna@mail.ru

Статья поступила: 23.04.2013 г., принята к печати: 24.07.2013 г.

В статье представлены современные данные отечественной и зарубежной литературы по проблеме противомикробной резистентности часто болеющих детей. Обсуждаются особенности иммунитета при острых респираторных инфекциях у детей с аллергическими заболеваниями. Представлена характеристика субпопуляций естественных регуляторных Т лимфоцитов и их транскрипционного фактора FOXP3 у часто болеющих детей. Описана динамика изменения содержания Treg и экспрессия FOXP3 у здоровых, часто болеющих и часто болеющих детей с аллергией. Установлено, что при аллергических заболеваниях у детей, независимо от их нозологии и тяжести течения, в крови повышено процентное содержание CD4⁺CD25^{hi}. Высказано предположение, что дефект функции Treg у часто болеющих детей с аллергией полностью или частично компенсируется за счет повышения численности клеток: в этом случае развивается ремиссия аллергического заболевания. Применение местных или ингаляционных глюкокортикостероидов при лечении обострения аллергического заболевания приводит к повышению экспрессии молекулярного маркера FOXP3, что можно рассматривать как один из механизмов их терапевтического действия.

Ключевые слова: часто болеющие дети, аллергия, естественные регуляторные Т лимфоциты, Treg, FOXP3, глюкокортикостероиды.

(Педиатрическая фармакология. 2013; 10 (4): 96–105)

A.D. Pertseva¹, N.Z. Zokirov², V.V. Troshina¹, L.S. Namazova-Baranova^{1, 3, 4}, S.Y. Tarakanova²

¹ Federal Medical-Biological Agency, Children's Health Research Center of The Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

² The Russian Research Medical University named after N.I. Pirogov, Ministry of Health and Social Development of Russia, Chair of Intermediate Level Pediatrics № 1 of Pediatric Faculty, Moscow

³ First Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation

⁴ Central Children's Hospital of Federal Medical-Biological Agency of Russia (CCH of FMBA), Moscow

Natural Regulatory T cells and Their Molecular Marker FOXP3 in Frequently Ill Pre-school Children Living in Areas with Human-Induced Impact

Our research presents the review of recent literature on microbial resistance in children suffered from recurrent respiratory infection (RRI). Special aspects of immune system in children with allergy and acute respiratory infection are discussed. We report the description of natural regulatory T lymphocytes subpopulations and their transcription factor FOXP3 in frequently ill children. Dynamic changes in Treg concentration and expression of FOXP3 in groups of healthy, children with RRI and children with combination of RRI and allergy are described. It is proved that in case of allergy despite its aetiology and severity, children have increased concentration of CD4⁺CD25^{hi} in blood. We suggest that in children with RRI and allergy an insufficient function of Treg is compensated by the increased number of cells and in this case they have a remission of allergy. Treatment of acute allergy by topical or inhaled glucocorticosteroids leads to the increased expression of molecular marker FOXP3 and can be considered as one of their modes of action.

Key words: frequently ill children, allergy, natural regulatory T lymphocytes, Treg, FOXP3, glucocorticosteroids.

(Pediatricheskaya farmakologiya — Pediatric pharmacology. 2013; 10 (4): 96–105)

В последние десятилетия, несмотря на значительные достижения в совершенствовании методов диагностики и лечения, отмечается снижение уровня здоровья детей, проживающих в условиях антропогенной нагрузки (мегаполисы, промышленные города). Это обусловлено влиянием экзопатогенных факторов и высоким уровнем стрессов, приводящих к снижению резистентности детского организма. В условиях развития технического прогресса и урбанизации это влияние возрастает в связи с увеличивающимся загрязнением воздуха, воды, почвы и других объектов внешней среды выбросами транспорта, промышленных предприятий.

Проблема частых респираторных инфекций у детей, непосредственно связанная с состоянием окружающей среды, продолжает оставаться в центре внимания педиатров.

Опыт отечественных и зарубежных исследователей подтвердил неизменность этиологических факторов и патогенетических основ частых респираторных заболеваний у детей, изложенных в действующем варианте программы Союза педиатров России по частоболлеющим детям и других научных работах последних лет [1–5]. Базисом развития хронического воспаления — частых респираторных инфекций — у детей является изменение иммунологических механизмов защиты организма. Эти изменения разнонаправлены и могут затрагивать все звенья иммунитета.

В настоящее время исследования иммунного статуса у большинства часто болеющих детей (ЧБД) выявили изменения противоинфекционной защиты [5, 6]. Наиболее часто отмечаются сдвиги в системе врожденного иммунитета, представляющего первую линию защиты от патогенов. Так, например, у ЧБД выявлено снижение уровня лизоцима в слюне. Почти у 87% ЧБД отмечается нарушение фагоцитарной функции клеток крови: лейкоциты способны к фагоцитозу, но их мобилизация в ответ на воспалительные стимулы снижена в 2–3 раза. При этом фагоцит не способен разрушать патоген (незавершенный фагоцитоз), а активные формы кислорода, ферменты выделяются во внеклеточную среду и вызывают местное повреждение тканей. Даже в период клинического благополучия и при отсутствии острой респираторной инфекции (ОРИ) у детей из этой диспансерной группы отмечается снижение иммуноглобулинов (Ig) классов G и A (менее 80 и 70 мг%, соответственно) [7, 8], достоверно повышенное содержание интерлейкинов (IL), участвующих в хронизации процессов воспаления (IL 6, IL 8), и сниженное содержание интерферонов (IFN), особенно IFN γ [9]. Кроме этого, продукция интерферонов лейкоцитами снижается в соответствии с циркадными биологическими ритмами в осенне-зимний период, определяя сезонные подъемы респираторной заболеваемости [10].

В исследованиях разных лет у ЧБД выявлялись изменения в адаптивном иммунитете: нарушения функциональной активности Т лимфоцитов, изменение количественного соотношения субпопуляций Т лимфоцитов.

Иммунный дисбаланс поддерживается дисбиотическими нарушениями слизистых оболочек верхних дыхательных путей и кишечника. Развитие дисбиоза кишечника у детей раннего возраста сопровождается истощением резервных возможностей незрелой системы иммунитета и дестабилизацией ее гомеостаза.

Описанные выше сдвиги в иммунном ответе у детей из группы часто болеющих следует трактовать как зависящие от преморбидного фона, от фазы воспалительного

процесса, сопутствующей патологии и других факторов, а не как проявления первичного иммунодефицита [11].

Совсем иная картина в патогенезе частых ОРИ развивается у детей, страдающих аллергией. Последняя, как известно, характеризуется поляризацией иммунного ответа в сторону Th2-типа: у таких детей недостаточно синтезируется IFN γ и IL 2, усилен синтез IgE и снижен IgG-антительный ответ [12]. Отсюда следует, что физиологические Th1-зависимые механизмы борьбы с респираторными инфекциями, как правило, нарушаются. Дети с аллергическими заболеваниями (атопическим дерматитом, респираторной аллергией) часто болеют ОРИ в грудном и раннем возрасте и могут быть отнесены в группу ЧБД. G. Ciprandi [13] в презентативной выборке изучил частоту и длительность респираторных инфекций у детей с аллергическими заболеваниями и без таковых. Было показано, что у детей, страдающих аллергическими заболеваниями, статистически значимо увеличивались количество эпизодов ОРИ (в 1,5–2 раза), длительность течения ОРИ (более чем в 1,5 раза) и тяжесть респираторных инфекций в сравнении с группой детей без аллергии.

В последнее время в представления о ведущей патогенетической роли дисбаланса Th1- и Th2-клеток при аллергии внесены существенные коррективы, связанные с признанием важной роли дефицита регуляторных Т клеток (Treg), в основном их функциональной недостаточности [14], в формировании предрасположенности к аллергическим болезням.

Основой представлений об участии Treg в ограничении аллергических процессов явился факт наличия у детей с IPEX-синдромом (носителей мутаций гена *FOXP3*) аллергических проявлений — экзематозного поражения кожи, пищевой аллергии с эозинофилией и повышенным уровнем IgE [15]. В целом же информация, касающаяся взаимосвязей Treg у часто болеющих детей с аллергией, немногочисленна.

С современных позиций, иммунная система является наиболее чувствительной к действию экологических неоднородностей в связи с тем, что в основе развития иммунного ответа лежит интенсивная пролиферация антигенспецифических клеток-предшественников. Такая экологическая восприимчивость делает возможным использование показателей иммунной системы как индикаторов воздействия этих факторов на организм ребенка. Сегодня создана стандартная и унифицированная методика оценки иммунологического статуса у взрослого населения, позволяющая установить нормативные параметры основных компонентов иммунной системы в исследуемом регионе. В педиатрии такого инструмента до настоящего времени не разработано. Прежде всего не определены нормативные параметры значимых компонентов иммунитета с учетом возрастных периодов дифференцировки и их роли в стабилизации гомеостаза иммунной системы у детей.

Важную роль в предотвращении патологических форм иммунного ответа на воздействие факторов окружающей среды, в том числе и у детей, играют именно регуляторные Т клетки. С середины 90-х годов XX века было описано несколько субпопуляций регуляторных Т лимфоцитов, как естественных (т.е. развивающихся в ходе реализации онтогенетической программы вне зависимости от внешних воздействий), так и адаптивных (индуцируемых антигенами в процессе иммунного ответа). К настоящему

Таблица 1. Критерии включения детей в группу часто болеющих (В.Ю. Альбицкий, А.А. Баранов, 1986)

Возраст ребенка	Частота эпизодов ОРЗ в год
До 1 года	4 и более
1–3 года	6 и более
4–5 лет	5 и более
Старше 5 лет	4 и более

Таблица 2. Распределение обследованных детей по группам в зависимости от выявленных заболеваний

Пункт А, n = 107 (%)	Пункт Б, n = 119 (%)
А _{ЧБД} , n = 27 (25,2)	Б _{ЧБД} , n = 32 (26,9)
А _{ЧБД + Алл.} , n = 46 (43)	Б _{ЧБД + Алл.} , n = 49 (41,2)
А _{сравн.} , n = 34 (31,8)	Б _{сравн.} , n = 38 (31,9)

времени наиболее детально изучены естественные Treg, маркерами которых служат мембранные молекулы CD4, CD25, CTLA-4 и внутриклеточный транскрипционный фактор FOXP3 [15].

Функциональная уникальность естественных Treg заключается в том, что, являясь факторами врожденного иммунитета, они во все возрастные периоды принимают участие в формировании адаптивного иммунитета, прежде всего инфекционного. Именно эта элитарная гомеостатическая характеристика естественных регуляторных Т лимфоцитов определяет их важную и разностороннюю роль в физиологическом благополучии иммунной системы и является критерием исследования содержания Treg и экспрессии их молекулярного маркера FOXP3 в качестве показателей для иммунологического мониторинга состояния здоровья детей, проживающих на территориях с различными экологическими характеристиками.

Таким образом, целью настоящего исследования являлось изучение содержания естественных регуляторных Т лимфоцитов, экспрессии их молекулярного маркера FOXP3 у часто болеющих детей дошкольного возраста, проживающих в условиях воздействия антропогенной нагрузки, и оценка эффективности иммунологического мониторинга.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Нами были использованы данные регистра системы медицинского мониторинга, созданные в Кировской области, для выполнения государственной программы по комплексной оценке состояния здоровья детей, проживающих в условиях антропогенной нагрузки (рис. 1).

Исследование было начато в 2009 г.: изучено и проанализировано 1686 карт медицинских осмотров детей от 0 до 18 лет, проживающих на территории одной области (форма № 025/у-04 «Медицинская карта амбулаторного больного»). Из них 772 карты детей, проживающих в пункте А (населенный пункт, находящийся в зоне защитных мероприятий в регионе расположения химического производства) и 914 карт детей, проживающих в пункте Б (населенный пункт, находящийся в экологически чистом районе).

В результате проведенной работы в каждом из населенных пунктов было сформировано по 2 группы карт

детей: первая состояла из карт детей диспансерной группы наблюдения — часто болеющих (ЧБД), вторая — из карт условно-здоровых детей, которые составили в дальнейшем группу сравнения.

Критериями включения в группу часто болеющих детей в обоих населенных пунктах являлось:

- возраст 4–6 лет;
- ОРИ ≥ 5 раз в год для детей 4–5 лет, ОРИ ≥ 4 раза в год для детей старше 5 лет (по В.Ю. Альбицкому, А.А. Баранову, 1986; табл. 1);
- место рождения и постоянное место жительства вплоть до момента обследования — Кировская область (населенный пункт А и Б, соответственно);
- место работы родителей детей вне химического производства.

Критериями исключения из выборки служили:

- возраст младше 3 лет 6 мес и старше 6 лет 6 мес;
- ОРИ ≤ 5 раз в год для детей 4–5 лет, ОРИ ≤ 4 раза в год для детей старше 5 лет;
- место рождения и временное проживание — вне населенных пунктов А и Б Кировской области, соответственно;
- место работы родителей детей на химическом производстве.

Критериями включения в группы сравнения в обоих населенных пунктах были:

- возраст 4–6 лет;
- место рождения и постоянное место жительства вплоть до момента обследования — в населенных пунктах А и Б, соответственно;
- место работы родителей детей вне химического производства.

Критерии исключения из группы сравнения:

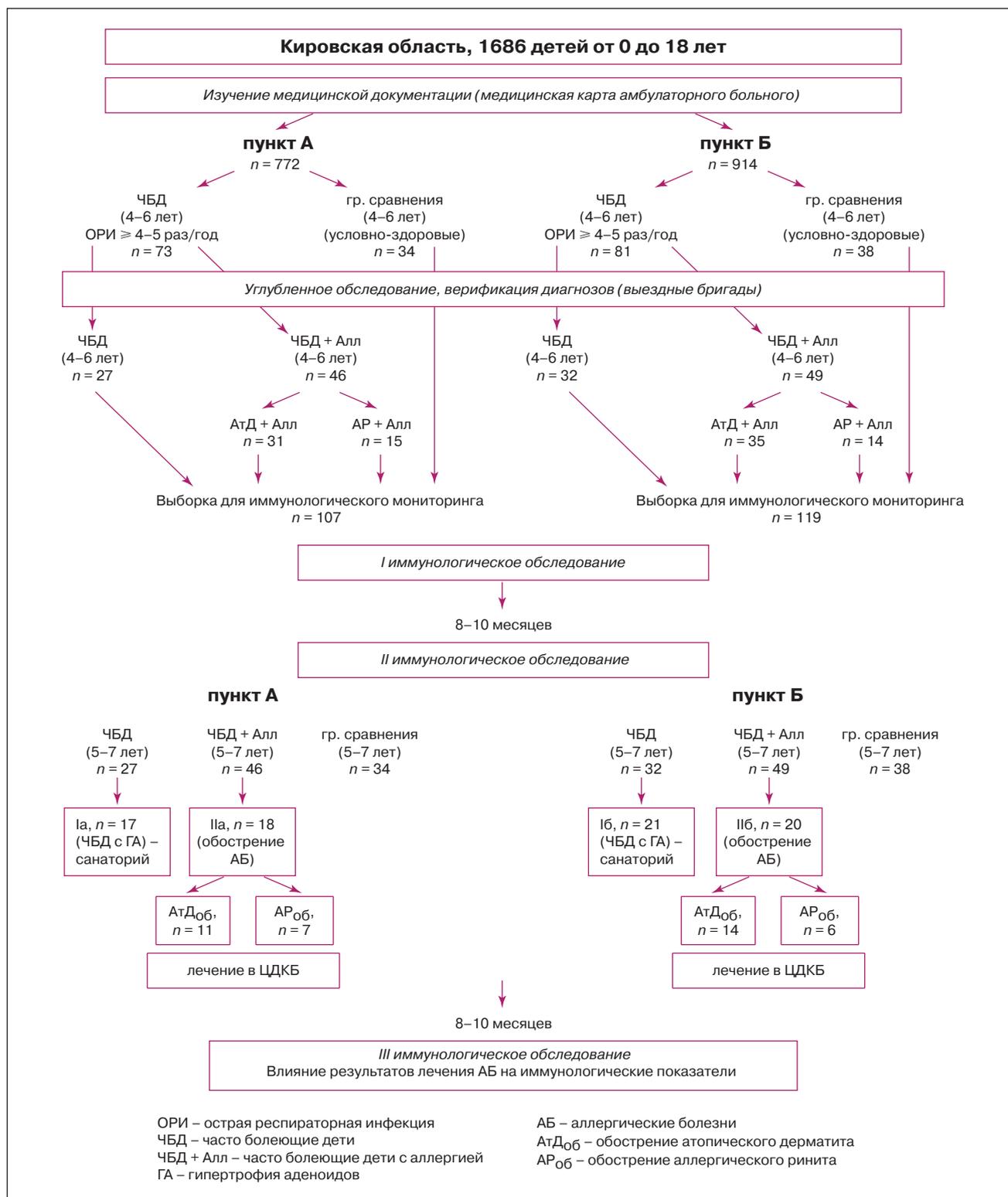
- возраст младше 3 лет 6 мес и старше 6 лет 6 мес;
- место рождения и временное проживание — вне выше обозначенных населенных пунктов;
- место работы родителей детей на химическом производстве.

Таким образом, в группе ЧБД в пункте А ($n = 772$) было выделено 73 карты детей (9,5% от общего числа проанализированных в населенном пункте А), а в группу сравнения вошло 34 карты условно-здоровых детей (4,4%). Аналогично в пункте Б ($n = 914$) группа ЧБД состояла из 81 карты детей (8,7% от общего числа проанализированных в населенном пункте), а группа сравнения — из 38 (4,2%). В населенном пункте А группа ЧБД и группа сравнения статистически достоверно не отличались от аналогичных групп детей в населенном пункте Б ($p > 0,05$). С учетом числа карт условно-здоровых детей, составивших группу сравнения, выборка для иммунологического мониторинга составила 107 и 119 детей в пунктах А и Б, соответственно ($p > 0,05$).

На следующем этапе нашего исследования основным методом получения информации о состоянии здоровья детей являлись результаты проведения медицинских осмотров детского населения силами выездных бригад в следующем составе: педиатр, хирург-ортопед, психоневролог, эндокринолог, гастроэнтеролог, аллерголог, офтальмолог, отоларинголог, врач ультразвуковой и функциональной диагностики. При анализе структуры заболеваемости использовали Международную классификацию болезней 10-го пересмотра (МКБ-10).

В ходе углубленного обследования детей из сформированных групп и верификации установленных диа-

Рис. 1. Схема формирования выборок, групп и подгрупп обследованных детей с указанием основных этапов работы в ходе динамического исследования в населенных пунктах А и Б Кировской области (дизайн исследования)



гнозов в каждом из изучаемых населенных пунктов из группы ЧБД в отдельную группу были выделены часто болеющие дети с аллергическими заболеваниями (атопический дерматит, аллергический ринит), которые на момент обследования находились в состоянии клинической ремиссии (ЧБД + Алл) (см. рис. 1; табл. 2, 3). Для оценки выраженности клинических симптомов атопического дерматита у детей из этой

группы использовался индекс TIS (модификация SCORAD, 1997; scoring of atopic dermatitis — шкала атопического дерматита) с учетом площади пораженной кожи (S), интенсивности кожного процесса и выраженности зуда. Вычисление индекса TIS проводилось по формуле:

$$TIS = \text{площадь поражения} / 5 + 3,5 \times \text{интенсивность.}$$

Таблица 3. Распределение обследованных детей по полу и месту проживания (населенные пункты А и Б)

Показатель	Пункт А	Пункт Б	Всего
Мальчики (%)	45 (42)	54 (45,4)	99 (43,8)
Девочки (%)	62 (58)	65 (54,6)	127 (56,2)
Итого:	107	119	226

Течение атопического дерматита считали легким при индексе TIS не более 20 баллов и средней степени при индексе не более 40.

Дети, включенные в исследование, были осмотрены **трижды**. Частота медицинских осмотров — 1 раз в 8–10 месяцев с 2010 по 2012 г. В ходе обследования все анализы выполнялись в одних и тех же лабораториях одними и теми же специалистами с использованием одинаковых реактивов одной и той же фирмы-изготовителя.

Все пациенты были обследованы по единой программе, которая включала сбор анамнеза жизни и заболевания, осмотр медицинскими выездными бригадами, выполнение клинического анализа крови с подсчетом лейкоцитарной формулы, исследование клеточного иммунитета с определением содержания Т лимфоцитов с фенотипами CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25^{hi} (регуляторных Т клеток) и их молекулярного маркера FOXP3. Клиническая часть обследования, кроме повторных осмотров, включала анализ данных алергоанамнеза.

Для выполнения иммунологического исследования использовали метод проточной цитофлуориметрии (для определения Т лимфоцитов с фенотипами CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD25^{hi}) и метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с предварительной обратной транскрипцией (для определения экспрессии гена FOXP3). Уровень экспрессии мРНК FOXP3 при ПЦР в режиме реального времени определяли относительно экспрессии мРНК гена «домашнего хозяйства» *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1) по формуле:

$$[Foxp3] / [HPRT1] = E_{HPRT1}^{Cp1} / E_{FOXP3}^{Cp2},$$

где E — эффективность амплификации, Cp1 — значение порогового цикла в образце для *HPRT1*, Cp2 — значение порогового цикла в образце для *FOXP3*.

При **первом осмотре** в населенных пунктах А и Б (октябрь 2010 г.) обследование детей проводилось в период клинической ремиссии как атопического дерматита, так и аллергического ринита.

Группы ЧБД в населенных пунктах А (27 детей) и Б (32 ребенка) составляли дети 4–5 лет, у которых частота эпизодов ОРИ была равна или превышала 5 случаев в год, и дети старше 5 лет с частотой равной или превышающей 5 случаев заболевания ОРИ в год. У 5 детей в населенном пункте А и у 8 детей в населенном пункте Б диагностирована гипертрофия небных миндалин I–II степени, что составило 18,5 и 22,2% от общего числа детей в группе, соответственно ($p > 0,05$).

В состав группы ЧБД + Алл в пункте А (46 детей) вошел 31 (67,4% от всей группы ЧБД + Алл) часто болеющий ребенок с атопическим дерматитом (АтД): у 23 детей (74,2% детей с АтД) заболевание имело легкое течение (TIS 6,4 ± 0,9 баллов), а у 8 детей (25,8%) — среднетяжелое течение (TIS 21,9 ± 2,6 баллов) и 15 (32,6% от всей группы ЧБД + Алл) часто болеющих детей с аллергическим ринитом: у 6 детей (40% от всех детей с АР) заболевание

носило персистирующий характер с сенсibilизацией к бытовым аллергенам и у 9 детей (60%) — сезонный интермиттирующий характер с возникновением симптомов заболевания во время цветения деревьев и трав. В обоих вариантах аллергический ринит характеризовался легким течением.

В группу ЧБД + Алл в пункте Б (49 детей) входило 35 часто болеющих детей с АтД (71,4% от всей группы ЧБД + Алл): у 26 детей (74,3% от всех детей с АтД) заболевание имело легкое течение (TIS 4,1 ± 0,6 баллов), а у 9 детей (25,7%) — среднетяжелое течение (TIS 18,7 ± 1,5 баллов) и 14 (28,6%) часто болеющих детей с аллергическим ринитом (АР): у 6 детей (42,9% от всех детей с АР) заболевание носило персистирующий характер с сенсibilизацией к бытовым аллергенам и у 8 детей (57,1%) — сезонный интермиттирующий характер с возникновением симптомов заболевания во время цветения деревьев и трав. В обоих вариантах течения аллергический ринит имел легкую степень, так же, как и в пункте А.

Таким образом, в пункте А группа часто болеющих детей с аллергией ($n = 46$) включала 31 ребенка с атопическим дерматитом (67,4%) и 15 детей с аллергическим ринитом (32,6%); 38 детей с легким течением заболевания (82,6%) и 8 со среднетяжелым (17,4%). В пункте Б ($n = 49$) у 40 детей (81,6%) отмечалось легкое течение аллергического заболевания, у 9 — среднетяжелое (18,4%). Разница между численностью детей с диагнозами «Атопический дерматит» и «Аллергический ринит», а также между клиническими формами заболевания и тяжестью течения в населенном пункте А и Б была статистически не достоверна ($p > 0,05$).

Группу сравнения в обоих населенных пунктах составили условно-здоровые дети, не состоящие на диспансерном учете по поводу хронической соматической или хирургической патологии. В обоих населенных пунктах у детей этой группы диагноз аллергического заболевания был исключен, алергологический анамнез отягощен не был.

При **втором обследовании** в обоих населенных пунктах в группах ЧБД без сопутствующей патологии по результатам дополнительно собранного анамнеза и осмотра оториноларинголога были выделены подгруппы детей с впервые установленным диагнозом «Аденоидные вегетации I–II степени»: в пункте А ($n = 27$) подгруппу Ia составили 17 детей (60,7%), в пункте Б ($n = 32$) в подгруппу Ib вошел 21 ребенок (65,6%). В связи с выявленным заболеванием и учетом принадлежности к диспансерной группе часто болеющих дети этих подгрупп были направлены на санаторно-курортное лечение, и к третьему обследованию у большей части детей обеих подгрупп [у 13 из Ia (76,5%) и 18 из Ib (85,7%)] диагноз гипертрофии аденоидов I–II степени был снят ($p > 0,05$).

В пункте А ($n = 46$) среди часто болеющих детей с аллергией при втором обследовании у 5 детей, страдающих атопическим дерматитом легкого течения (16,1%

от всех детей с АтД), и у 6 детей со среднетяжелым течением заболевания (19,4%) отмечалось обострение (TIS $18,2 \pm 1,7$ и $35,6 \pm 0,6$ баллов, соответственно; см. рис. 1). Среди детей с аллергическим ринитом у 3 пациентов с персистирующим характером течения заболевания (20% от общего числа детей с AP) и у 4 пациентов с сезонным интермиттирующим аллергическим ринитом (26,7%) также диагностировано обострение заболевания, проявлявшееся комплексом симптомов в виде заложенности носа, чихания, зуда и ринореи. Кроме того, родители пациентов жаловались на нарушение сна у детей, снижение двигательной активности и ухудшение настроения детей в связи с возникновением вышеперечисленных симптомов. Так, ко второму обследованию в целом в группе часто болеющих детей с аллергией у 18 (39,1%) детей из 46 отмечалось обострение аллергического заболевания (подгруппа IIa), из них обострение атопического дерматита у 11 детей (подгруппа Ат_{Доб}) и аллергического ринита у 7 детей (подгруппа AP_{об}).

Аналогичная картина течения аллергических заболеваний наблюдалась в населенном пункте Б ($n = 49$). Ко второму обследованию у 6 детей, страдающих атопическим дерматитом легкого течения (17,1% от общего числа детей с АтД), и у 8 детей со среднетяжелым течением заболевания (22,9%) отмечалось обострение (TIS $23,2 \pm 2,3$ и $38,3 \pm 0,9$ баллов, соответственно). Среди детей с аллергическим ринитом у 4 пациентов с персистирующим характером течения заболевания (28,6% от общего числа детей с AP) и у 2 пациентов с сезонным интермиттирующим аллергическим ринитом (13,3%) отмечалось обострение (заложенность носа, чихание, зуд, ринорея, нарушение сна, снижение двигательной активности). Таким образом, у 20 детей (40,8%) из 49 было зафиксировано обострение течения атопического дерматита или аллергического ринита (подгруппа IIб), из них обострение атопического дерматита у 14 детей (подгруппа Ат_{Доб}) и аллергического ринита у 6 детей (подгруппа AP_{об}).

В населенных пунктах А и Б разница между численностью детей с обострением атопического дерматита и аллергического ринита и тяжестью их течения была статистически не достоверна ($p > 0,05$).

В связи с обострением аллергического заболевания (атопический дерматит, аллергический ринит) дети вновь выделившихся подгрупп из обоих населенных пунктов (IIa и IIб) были направлены для лечения вышеобозначенных заболеваний в ЦДКБ ФМБА России, где получили курс терапии в соответствии с действующими протоколами.

В населенном пункте А при **третьем осмотре** группы часто болеющих детей с аллергией только у 1 ребенка со среднетяжелым течением детской формы атопического дерматита (TIS $27,1 \pm 1,3$ балла) отмечалось обострение течения заболевания, у остальных детей заболевание было в стадии клинической ремиссии (TIS $3,4 \pm 0,4$ и $19,9 \pm 1,2$ балла, соответственно). Также в населенном пункте Б при третьем осмотре у 3 детей со среднетяжелым течением атопического дерматита (TIS $28,9 \pm 0,5$ баллов) отмечалось обострение, у остальных детей заболевание было в стадии клинической ремиссии (TIS $4,6 \pm 0,2$ и $19,4 \pm 0,8$ баллов, соответственно).

В обоих населенных пунктах при третьем обследовании не было диагностировано никаких клинических проявлений аллергического ринита среди детей из группы с соответствующей патологией.

В группах сравнения при трехкратном динамическом наблюдении не было отмечено ухудшения в состоянии здоровья условно-здоровых детей.

При статистической обработке численности групп (ЧБД, ЧБД + Алл, группы сравнения) и их подгрупп в населенном пункте А и соответствующих им групп и подгрупп в населенном пункте Б статистически значимых различий найдено не было ($p > 0,05$).

Обработку цитометрических файлов осуществляли с помощью прикладной программы «WinMDI 2.8» (Microsoft).

Ввод, обработку и документирование изображений гелей при работе с телевизионными камерами через устройства видеозаписи, использующие WDW-драйверы в оперативной системе WXP (Professional), проводили с помощью специализированного программного обеспечения «Gel Imager 2.0».

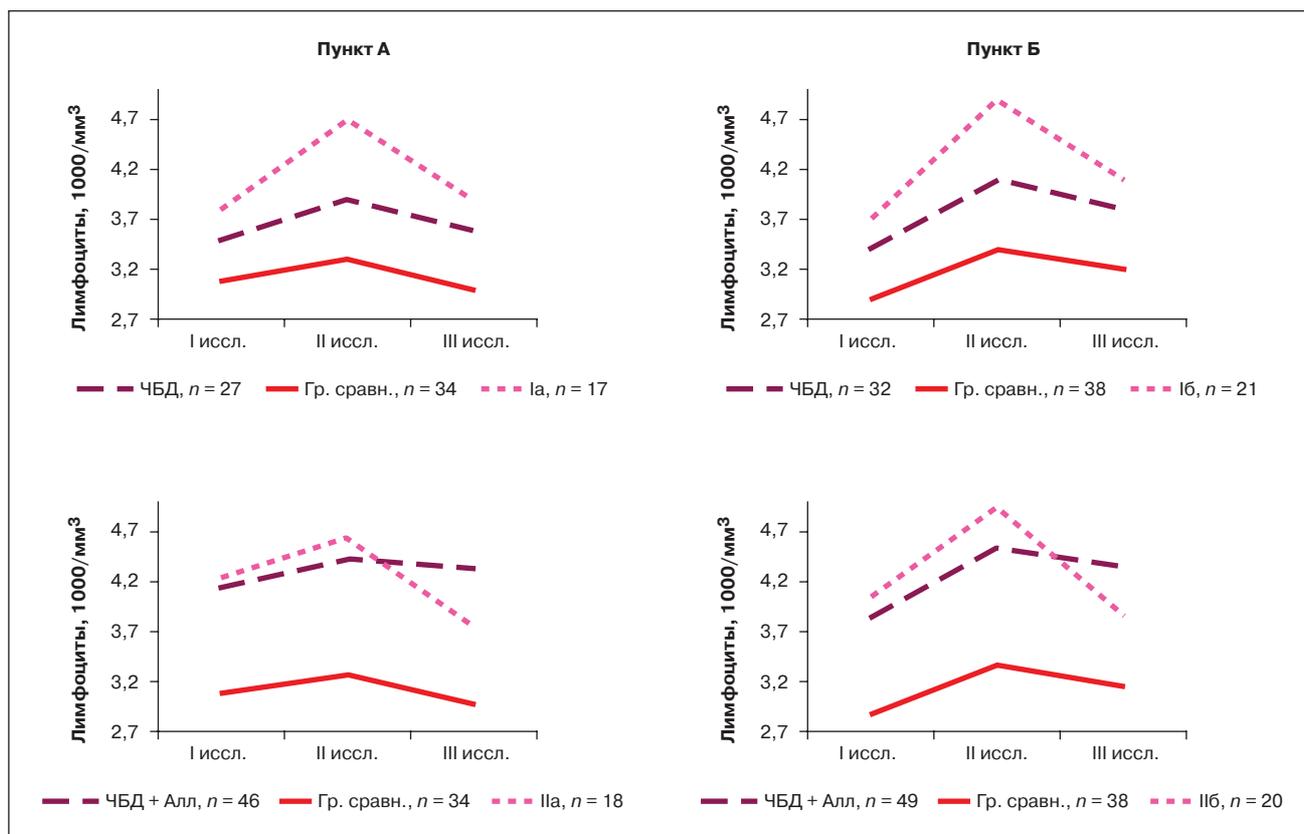
Исследованные количественные показатели представляли в виде Me (L–H), где Me — медиана, L — нижний квартиль, H — верхний квартиль. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использован U-критерий Манна–Уитни, нескольких групп — метод сравнения Краскела–Уоллиса с последующим (в случае $p < 0,05$) парным сравнением групп с использованием теста Манна–Уитни с поправкой Бонферрони при оценке значения p . Для выявления взаимосвязи переменных проводили расчет коэффициента ранговой корреляции по Спирмену. Различия групп полагали статистически значимым при $p < 0,05$. Обработку проводили в программном пакете «StatSoft Statistica».

РЕЗУЛЬТАТЫ ОБСЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе проведения иммунологического мониторинга в населенном пункте А выявлены следующие изменения в гемограмме периферической крови:

- содержание лейкоцитов и лимфоцитов в абсолютных значениях в целом в группе ЧБД без сопутствующих заболеваний ($n = 27$) статистически достоверно не отличалось от группы сравнения ($n = 34$; $p > 0,05$). Статистически значимое увеличение количества лимфоцитов в абсолютных значениях отмечалось только в подгруппе Ia (ЧБД + ГА, $n = 17$) при 2-м обследовании, где впервые были диагностированы аденоидные вегетации I–II ст. ($p < 0,05$), однако, значения этого показателя не отличались от группы ЧБД в целом ($p > 0,05$). После санаторно-курортного лечения детей подгруппы Ia при 3-м обследовании отмечалось статистически достоверное снижение количества лимфоцитов в абсолютных значениях относительно этого же показателя у детей группы сравнения ($p > 0,05$; рис. 2);
- содержание лейкоцитов в группе ЧБД + Алл ($n = 46$) при повторных исследованиях статистически достоверно от группы сравнения ($n = 34$) не отличалось ($p > 0,05$), а содержание лимфоцитов в абсолютных значениях в группе ЧБД + Алл ($n = 46$) относительно группы сравнения ($n = 34$) было статистически достоверно выше ($p < 0,05$);
- при 2-м обследовании содержание лимфоцитов в абсолютных значениях в подгруппе детей IIa, где отмечалось обострение атопического дерматита (Ат_{Доб}, $n = 11$) и аллергического ринита (AP_{об}, $n = 7$), было статистически достоверно выше, чем значения этого же

Рис. 2. Содержание лимфоцитов в абсолютных значениях у детей групп ЧБД и ЧБД + Алл, подгрупп Ia, Ib, IIa, IIб и группы сравнения при динамическом наблюдении в населенных пунктах А ($n = 107$) и Б ($n = 119$)



показателя детей группы сравнения ($p < 0,05$), и статистически достоверно не отличался от ЧБД + Алл в целом ($p > 0,05$). После проведенного лечения местными и ингаляционными глюкокортикостероидами содержание лимфоцитов в абсолютных значениях в вышеуказанных подгруппах детей снизилось и статистически достоверно не отличалось от количества лимфоцитов условно-здоровых детей ($p > 0,05$; см. рис. 2).

У детей обследуемых групп в населенном пункте Б выявлены аналогичные изменения в гемограмме периферической крови:

- в ходе иммунологического мониторинга содержание лейкоцитов и лимфоцитов в абсолютных значениях в группе ЧБД ($n = 32$) статистически достоверно не отличалось от группы сравнения ($n = 38$; $p > 0,05$). Статистически значимый лимфоцитоз отмечался только при 2-м обследовании в подгруппе Iб (ЧБД + ГА, $n = 21$), однако, значения лимфоцитов в абсолютных значениях при этом не отличались от группы ЧБД в целом ($p > 0,05$). После санаторно-курортного лечения детей подгруппы Iб (ЧБД + ГА) при 3-м обследовании отмечалось статистически достоверное снижение количества лимфоцитов в абсолютных значениях относительно этого же показателя у детей группы сравнения ($p > 0,05$; см. рис. 2);
- содержание лейкоцитов в группе ЧБД + Алл ($n = 49$) при повторных исследованиях статистически достоверно от группы сравнения ($n = 38$) не отличалось ($p > 0,05$), а содержание лимфоцитов в абсолютных значениях в группе ЧБД + Алл ($n = 49$) относительно

группы сравнения ($n = 38$) было статистически достоверно выше ($p < 0,05$);

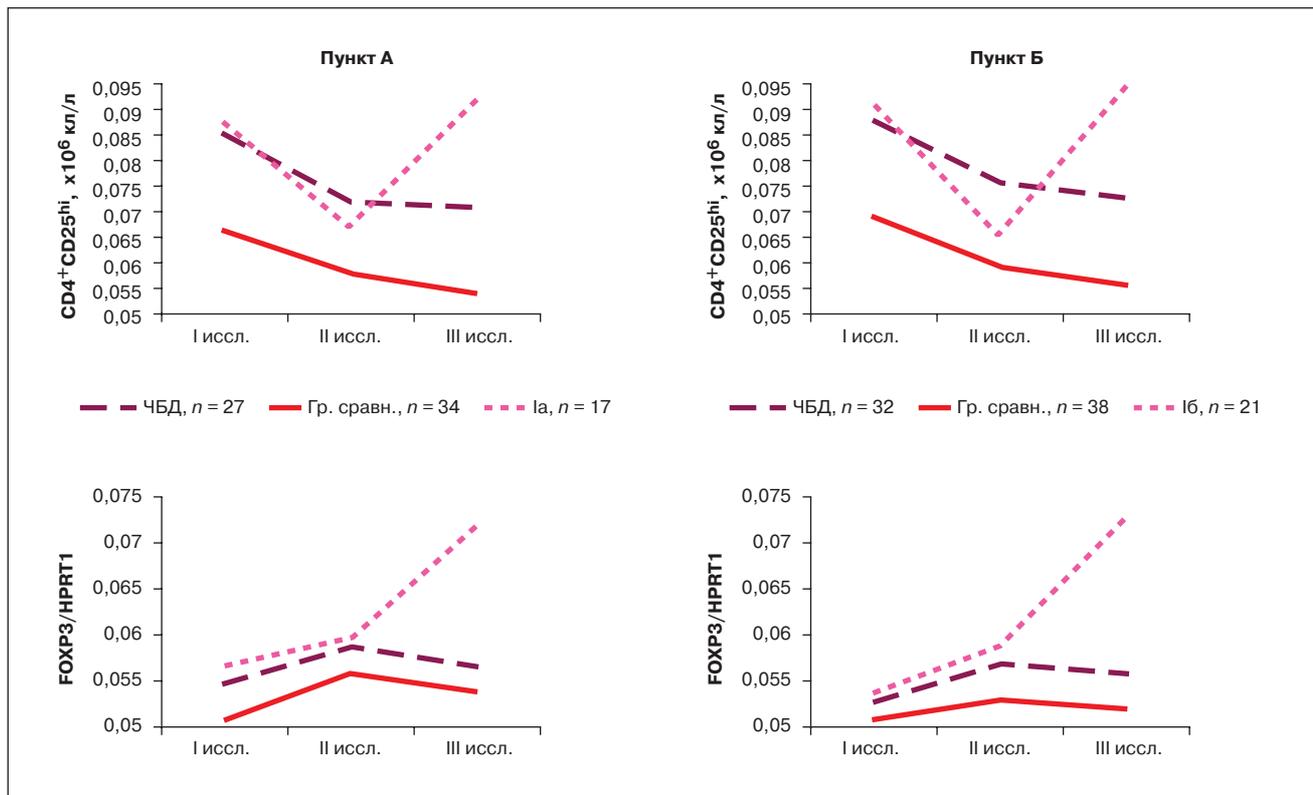
- содержание лимфоцитов в абсолютных значениях во 2-м обследовании в подгруппе детей IIб с обострением атопического дерматита ($Ат_{Доб}$, $n = 14$) и аллергического ринита ($АР_{об}$, $n = 6$) было статистически достоверно выше, чем значения этого же показателя у детей группы сравнения ($p < 0,05$), и статистически достоверно не отличалось от ЧБД + Алл в целом ($p > 0,05$). После проведенного лечения местными и ингаляционными глюкокортикостероидами содержание лимфоцитов в абсолютных значениях в вышеуказанных подгруппах детей снизилось и статистически достоверно не отличалось от количества лимфоцитов у условно-здоровых детей ($p > 0,05$; см. рис. 2).

В процессе исследования содержания лейкоцитов и лимфоцитов у детей, проживающих в населенных пунктах А и Б, группы ЧБД и ЧБД + Алл при 3-кратном исследовании с интервалом 8–10 мес, статистически достоверной разницы выявлено не было ($p > 0,05$). Однако, содержание лимфоцитов в абсолютных значениях в подгруппах Ia и Iб при 2-ом обследовании и в группе детей ЧБД + Алл в течение всего периода проведения исследований были статистически достоверно выше в обоих населенных пунктах относительно группы сравнения ($p < 0,05$; см. рис. 2).

Исследование естественных регуляторных Т лимфоцитов и их молекулярного маркера FOXP3.

В населенном пункте А ($n = 107$) при сравнении групп ЧБД и условно-здоровых детей было выявлено, что абсолютное содержание $CD4^+CD25^{hi}$ в группе

Рис. 3. Содержание $CD4^+CD25^{hi}$ субпопуляции Т лимфоцитов и экспрессия гена *FOXP3* у ЧБД, подгрупп Ia, Ib (ЧБД + ГА) и группы сравнения при динамическом наблюдении в населенных пунктах А ($n = 107$) и Б ($n = 119$)



ЧБД ($n = 27$) было выше, но статистически достоверно не отличалось от значений группы сравнения ($n = 34$) во время 1, 2 и 3-го обследования ($p > 0,05$). В подгруппе детей Ia (ЧБД + ГА, $n = 17$) с впервые установленным диагнозом аденоидных вегетаций I–II ст. при 2-м обследовании содержание Т лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}$ было выше, но также статистически достоверно не отличалось от этого показателя у детей группы сравнения ($n = 34$; $p > 0,05$). К 3-му обследованию после проведенного санаторно-курортного лечения у детей указанной подгруппы отмечалось статистически достоверное повышение содержания $CD4^+CD25^{hi}$ в абсолютных значениях относительно условно-здоровых детей ($p < 0,05$; рис. 3).

В целом в группе ЧБД без сопутствующей патологии ($n = 27$) экспрессия гена *FOXP3* статистически достоверно не отличалась от экспрессии того же показателя у детей группы сравнения ($n = 34$; $p > 0,05$). После санаторно-курортного лечения у детей из подгруппы Ia с впервые выставленным диагнозом аденоидных вегетаций I–II ст. при 2-м обследовании отмечалось статистически значимое повышение экспрессии мРНК *FOXP3* относительно условно-здоровых детей ($p < 0,05$; см. рис. 3).

Такие же изменения иммунологических показателей отмечались у детей соответствующей группы в населенном пункте Б ($n = 119$): при сравнении групп ЧБД ($n = 32$) и условно-здоровых детей ($n = 38$) выявлено, что абсолютное содержание $CD4^+CD25^{hi}$ в группе ЧБД было выше, но статистически достоверно не отличалось от значений группы сравнения во время 1, 2 и 3-го обследования ($p > 0,05$). В подгруппе детей Ib (ЧБД + ГА, $n = 21$) с впервые установленным диагнозом аденоидных вегетаций I–II ст. при 2-м обследовании содержание Т лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^{hi}$ было выше, но также статистически достоверно не отличалось от того показателя детей группы сравнения ($n = 38$; $p > 0,05$). После проведенного санаторно-курортного лечения детей указанной подгруппы (3-е обследование) отмечалось статистически достоверное повышение содержания $CD4^+CD25^{hi}$ в абсолютных значениях относительно условно-здоровых детей ($p < 0,05$).

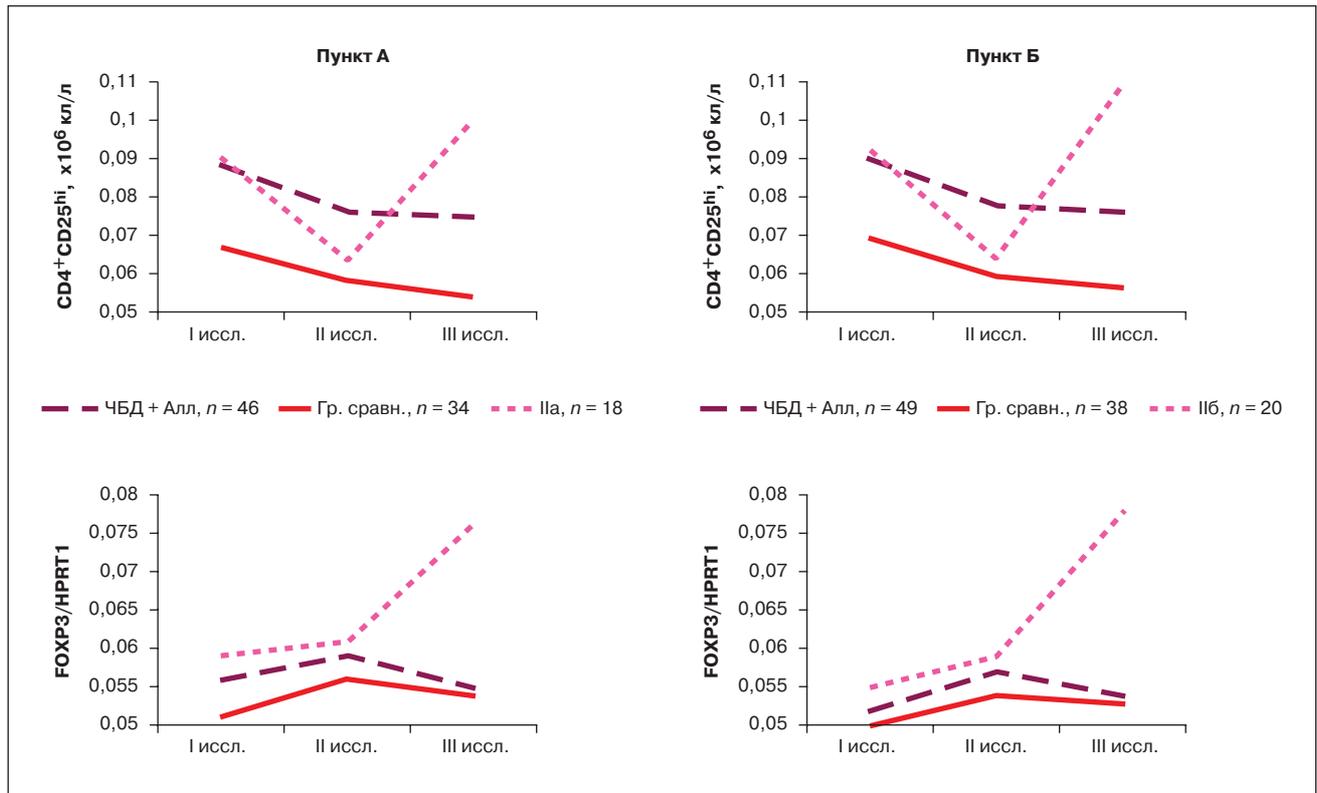
В группе ЧБД ($n = 32$) экспрессия гена *FOXP3* статистически достоверно не отличалась от экспрессии того же показателя у детей группы сравнения ($n = 38$; $p > 0,05$). После санаторно-курортного лечения у детей из подгруппы Ib ($n = 21$) отмечалось статистически значимое повышение экспрессии мРНК *FOXP3* относительно условно-здоровых детей ($p < 0,05$).

Прямая корреляция между количеством Treg и экспрессией гена *FOXP3* выявлена только в группе сравнения в обоих населенных пунктах (коэффициент корреляции по Спирмену): $r = 0,75$; $p = 0,0008$ — для корреляции экспрессии мРНК *FOXP3* и абсолютного содержания $CD4^+CD25^{hi}$; $r = 0,65$; $p = 0,007$ — для корреляции экспрессии мРНК *FOXP3* и относительного содержания $CD4^+CD25^{hi}$.

При проведении исследования в обоих населенных пунктах разница между содержанием $CD4^+CD25^{hi}$ и экспрессией мРНК *FOXP3* у ЧБД при трехкратном исследовании как в самих выделенных группах, так и в сформированных подгруппах (Ia и Ib) была статистически не достоверна ($p > 0,05$; см. рис. 3).

В ходе иммунологического мониторинга в населенном пункте А при сравнении групп ЧБД + Алл и условно-

Рис. 4. Содержание $CD4^+CD25^{hi}$ субпопуляции Т лимфоцитов и экспрессия гена *FOXP3* у ЧБД + Алл, подгрупп IIa, IIб и группы сравнения при динамическом наблюдении в населенных пунктах А ($n = 107$) и Б ($n = 119$)



здоровых детей было выявлено, что процентное содержание Treg в группе детей с аллергией статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($p = 0,03$): в группе ЧБД + Алл относительное количество $CD4^+CD25^{hi}$ в течение всего исследуемого периода составило в среднем 3,4%, в группе сравнения — 2,5%.

При оценке рассматриваемых показателей у детей с различной активностью аллергического процесса было обнаружено, что повышение содержания Treg в абсолютных значениях статистически не достоверно во время обострения заболевания ($p = 0,16$) и значимо только в период ремиссии ($p = 0,02$) по сравнению с условно-здоровыми детьми (рис. 4).

При проведении 2-го обследования в обоих населенных пунктах обнаружено, что у детей с обострением как atopического дерматита, так и аллергического ринита повышение содержания Treg в абсолютных значениях было статистически не достоверно относительно детей группы сравнения ($p > 0,05$) и статистически значимо лишь в период ремиссии аллергии ($p < 0,05$), которая наблюдалась при 3-м обследовании детей после лечения в ЦДКБ ФМБА России местными (в случае обострения atopического дерматита) или интраназальными (аллергический ринит) глюкокортикостероидами.

Во время обострения аллергического процесса (как atopического дерматита, $At_{доб}$, так и аллергического ринита, $AR_{об}$) абсолютные значения Treg статистически не достоверно снижаются по сравнению с этим показателем в группе ЧБД + Алл в целом ($p > 0,05$), и также статистически не достоверно повышаются после лечения во время ремиссии ($p > 0,05$). Помимо этого отмечена тождественная динамика значения этого показателя в группах с AtD и AR в зависимости от стадии заболева-

ния и активности процесса ($p > 0,05$) как в пункте А, так и в пункте Б ($p > 0,05$).

В обоих населенных пунктах, входящих в исследование, при сравнении показателей детей внутри группы часто болеющих детей с аллергическими заболеваниями было выявлено, что значения показателей, характеризующих субпопуляцию Treg (численность $CD4^+CD25^{hi}$, экспрессия *FOXP3*), не различаются при разных клинических проявлениях аллергии (atopический дерматит, аллергический ринит) ($p > 0,05$ для критерия Краскела–Уоллиса). Эти показатели не отличались друг от друга в зависимости от тяжести течения аллергического процесса ($p > 0,05$ для критерия Краскела–Уоллиса) в соответствующих подгруппах обоих населенных пунктов (см. рис. 4).

Прямая корреляция между количеством Treg и геном *FOXP3* выявлена только в группе сравнения (коэффициент корреляции по Спирмену $r = 0,75$; $p = 0,0008$ для корреляции экспрессии мРНК *FOXP3* и абсолютного содержания $CD4^+CD25^{hi}$; $r = 0,65$; $p = 0,007$ для корреляции экспрессии мРНК *FOXP3* и относительного содержания $CD4^+CD25^{hi}$).

Лечение детей местными (подгруппа $At_{доб}$) или интраназальными (подгруппа $AR_{об}$) глюкокортикостероидами (ИГКС) в обоих населенных пунктах приводило к статистически значимому повышению экспрессии мРНК *FOXP3* по сравнению с группой условно-здоровых детей ($p < 0,05$). При этом наиболее высокая экспрессия гена *FOXP3* отмечалась в период ремиссии после терапии ИГКС как в подгруппе IIa, так и в подгруппе IIб, что статистически значимо превышало уровень этого показателя у детей в группе сравнения ($p < 0,05$).

Однако, у отдельных детей из подгрупп IIa и IIб, находившихся на лечении в ЦДКБ ФМБА России, после про-

веденной терапии не отмечалось повышение экспрессии мРНК FOXP3, что может свидетельствовать о прогностически неблагоприятном течении аллергического заболевания.

Обследование показало, что в обоих населенных пунктах содержание Treg у детей в группе сравнения постепенно снижается с возрастом (в пункте А: $0,066-0,054 \times 10^6$ /л, в пункте Б: $0,069-0,056 \times 10^6$ /л; $p > 0,05$). Экспрессия гена FOXP3 практически не менялась с возрастом, составляя 0,051–0,054 (относительно экспрессии гена HPRT1) и 0,05–0,053 в населенном пункте А и Б, соответственно ($p > 0,05$).

В целом в группе часто болеющих детей с аллергией в возрасте до 6 лет наблюдалось снижение содержания Treg по сравнению с таковым в группе сравнения. Однако, дальнейшего снижения численности этих клеток не происходило, и в возрасте 6–8 лет (к 3-му обследованию) и старше их абсолютное содержание было выше, чем у часто болеющих детей без аллергии и детей группы сравнения, составляя 0,074 против 0,071 и 0,054 кл/л, соответственно, в пункте А ($p < 0,05$) и 0,076 против 0,073 и 0,053 кл/л, соответственно, в пункте Б ($p < 0,05$). Аналогичных изменений экспрессии гена FOXP3 не отмечалось.

При изучении особенностей динамики Treg в циркуляции было выявлено снижение клеток при обострении и повышение их во время ремиссии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процентное содержание CD4⁺CD25^{hi} среди мононуклеаров периферической крови при аллергических заболеваниях было повышено независимо от вида заболевания и его тяжести течения. Повышение проявляется особенно четко при ремиссии заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аллергия у детей: от теории — к практике: монография. Под ред. Л.С. Намазовой-Барановой. М.: Союз педиатров России. 2010–2011. 668 с.
2. Намазова-Баранова Л.С., Харит С.М., Тузанкина И.А., Кожевникова Т.Н., Таранушенко Т.Е., Алексеева А.А. Результаты многоцентрового исследования применения препарата пидоти-мод для профилактики острых респираторных инфекций у часто болеющих детей. *Вопросы современной педиатрии*. 2010; 9 (2): 40–44.
3. Торшхоева Р.М., Ботвиньева В.В., Таги-заде Т.Г., Намазова Л.С., Таранушенко Т.Е. Часто болеющие дети мегаполисов: лечение и профилактика острых респираторных инфекций. *Педиатрическая фармакология*. 2006; 3 (1): 13–17.
4. Cohen R., Just J., Koskas M. et al. Gaudelus Infections respiratoires recidivantes: quel bilan, quels traitements? *Archives de pediatrie*. 2005; 12: 183–190.
5. Намазова-Баранова Л.С. Научные исследования и инфраструктура платформы «Педиатрия». *Педиатрическая фармакология*. 2012; 9 (4): 15–24.
6. Щербина А.Ю. Общие вопросы формирования иммунного ответа. Клинико-лабораторная оценка иммунологических нарушений. Программа ОЛИМП (Основы клинической иммунологии для педиатров). *Рос. аллерголог. журнал*. 2010; 3: 58–66.
7. Bossuyt X., Moens L., Van Hoeyveld E. Coexistence of (Partial) Immune Defects and Risk of Recurrent Respiratory Infections. *Clinical Chemistry*. 2007; 53: 124–130.

При этом экспрессия FOXP3 в мононуклеарной фракции не изменяется. Повышение содержания Treg при аллергии, вероятно, сопровождалось ослаблением функции этих клеток. Отсутствие увеличения численности Treg, наблюдаемое при рецидивах аллергических процессов, можно рассматривать как фактор, способствующий обострению болезни (отсутствие или недостаточность компенсации).

Применение кортикостероидов повышает экспрессию FOXP3, что можно рассматривать как один из механизмов их терапевтического действия.

Изменение содержания Treg в возрастном аспекте показывает, что в норме содержание Treg постепенно снижается с возрастом, тогда как у часто болеющих детей, в том числе с аллергией, проявляется лишь начальный этап этого снижения (до 5–7 лет), который в дальнейшем остается незавершенным. Оценить значимость этой особенности онтогенеза Treg для развития аллергопатологии пока не представляется возможным.

Результаты исследования достоверно показывают, что полная картина изменений в популяции Treg при аллергии может быть достигнута лишь при сочетанном применении фенотипической характеристики и оценки экспрессии гена FOXP3.

С учетом гипотезы о недостаточности компенсации функционального дефицита Treg как причины обострений аллергических заболеваний представляется возможным сформулировать следующие положения:

- первичным изменением Treg при аллергии является ослабление их функции;
- при благоприятном течении процесса, проявляющемся клинической ремиссией, это снижение функции клеток вызывает компенсаторное увеличение их численности.

8. Ozkan H., Atlihan F., Genel F., Targan S., Gunvar T. IgA and/or IgG subclass deficiency in children with recurrent respiratory infections and its relationship with chronic pulmonary damage. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2005; 15 (1): 69–74.
9. Захарова И.Н., Чебуркин А.В., Малиновская В.В. Значение системы интерферонов в формировании иммунного ответа у детей с острыми респираторными вирусными инфекциями. *Вопросы практической педиатрии*. 2009; 4 (5): 38–45.
10. Martino M., Ballotti S. The child with recurrent respiratory infections: normal or not? *Pediatr Allergy Immunol*. 2007; 18: 13–8.
11. Самсыгина Г.А. Часто болеющие дети: проблемы патогенеза, диагностики и терапии. *Педиатрия*. 2005; 1: 66–73.
12. Bellinghausen I., Klostermann B., Knop J., Saloga J. Human CD4+CD25+ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress Th1 and Th2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111: 862–868.
13. Ciprandi G. Allergic children have more numerous and severe respiratory infections than non-allergic children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006; 17 (5): 389–391.
14. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3. *Иммунология*. 2006; 34 (3): 176–188.
15. Halabi-Tawil M. Cutaneous manifestations of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome. *Br J Dermatol*. 2009; 160 (3): 645–51.
16. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. FOXP3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003; 4: 330–336.