



Національний медичний університет імені О. О. Богомольця  
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Юр'єв Сергій Дмитрович**

**УДК: 616.24-036.22-002.11:616.98-036.1-053.2**

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**«ІМУНОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПАТОГЕНЕЗУ, ДІАГНОСТИКИ ТА  
ТЕРАПІЇ ЦІЛОРІЧНОГО РИНИТУ У ХВОРИХ ІЗ СЕНСИБІЛІЗАЦІЄЮ ДО  
КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ»**

Спеціальність 222 – «Медицина»  
Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело.

Юр'єв С.Д.

Науковий керівник: Курченко Андрій Ігорович, доктор медичних наук, професор

На електронний документ накладено: 1 (Один) підписи чи печатки. На момент друку копії, підписи чи печатки перевірено: Програмний комплекс: eSign v. 2.3.0;  
Засіб кваліфікованого електронного підпису чи печатки: ІТ Користувач ЦСК-1Експертний  
висновок: №05/02/02-1424 від 05.04.2016;  
Цілісність даних: не порушена; Підпис № 1 (реквізити підписувача та дані сертифіката) Підписувач: ЮР'ЄВ  
СЕРГІЙ ДМИТРОВИЧ 2595713657; Належність до Юридичної особи: ФІЗИЧНА ОСОБА; Код юридичної особи  
в ЄДР: 2595713657;  
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 5E984D526F82F38F0400000014CA31012ED99604; Видавець  
кваліфікованого сертифіката: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"; Тип носія особистого ключа:  
Незахищений; Тип підпису: Удосконалений; Сертифікат: Кваліфікований; Час та дата підпису: 20:29 23.11.2023;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для підпису від АЦСК (кваліфікованого надавача  
електронних довірчих послуг)



Київ-2023

## АНОТАЦІЯ

**Юр'єв С.Д.** Імунологічні особливості патогенезу, діагностики та терапії цілорічного риніту у хворих із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилю – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина (галузь знань 14.03.08 – імунологія та алергологія). – Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОН України, Київ, 2023.

**Мета дослідження** – вивчити особливості клінічного перебігу та встановити ефективність алерген-специфічної імунотерапії (АСІТ) алергічного риніту (АР) у пацієнтів із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилю (КДП) на основі оцінки функціонального стану імунної системи при ІgЕ-залежній і ІgЕ-незалежній формах алергічного риніту.

У дисертаційній роботі проведено визначення молекулярного профілю сенсibilізації до КДП, проведено порівняльний аналіз альтернативних методів оцінки гіперчутливості у осіб із алергією до КДП. Визначено особливості імунної відповіді та підходи до лікування у пацієнтів з різними патогенетичними механізмами розвитку АР – ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формами. Науково обґрунтовано та доведено ефективність застосування АСІТ у пацієнтів з ІgЕ-залежною формою АР, доведено точність персоніфікованого підходу до її застосування.

В процесі дослідження було проведено верифікацію алергії у 112 пацієнтів за наступними клінічними ознаками: у 85 (75,9%) хворих були скарги на періодичне/постійне чихання, у 77 (68,7%) – на періодичну ринорею, у 84 (75,0%) – закладеність носа, у 74 (66,1%) – свербіж носа/очей, у 54 (48,2%) – ринокон'юнктивіт, у 44 (39,3%) – сухість шкірних покривів, у 29 (26,9%) – еритематозно-сквамозні висипання на шкірі верхніх кінцівок, верхньої частини грудної клітки, шиї тощо зі свербіжем, у 25 (22,3%) – рецидивний бронхообструктивний синдром (БОС). У загальному аналізі крові (ЗАК) у 22

(19,6%) осіб виявлена еозинофілія легкого ступеня (від 0,6 до 1,5 Г/л). У мазку-відбитку слизової порожнини носа у 52 (46,4%) осіб виявлена збільшена кількість еозинофілів (від 17% до 75% у полі зору).

Найчастіше серед обстежених пацієнтів був діагностований персистивний (цілорічний) АР - 31 (27,7%) особа та інтерміттивний (сезонний) АР - 29 (25,8%) осіб.

Обтяжений сімейний алергологічний анамнез щодо розвитку АЗ зафіксований у 61 особи (54,5%): в обох батьків у 4 (6,6%) осіб, тільки у батька – 16 (26,2%), тільки у матері – в 15 (24,6%), у близьких родичів – 26 (42,6%).

Діагностика сенсibiliзації до КДП, проводилась з використанням шкірних прик-тестів (ШПТ), загального та специфічного IgE. При оцінці ефективності застосування ШКП в порівнянні з сучасними методами молекулярної алергодіагностики з використанням тесту ALEX2 та при порівнянні результатів ШПТ з результатами молекулярної діагностики виявлено високий ступінь співпадіння результатів алергодіагностики цими двома методами. Порівняльний аналіз *in vitro* та *in vivo* методів алергодіагностики вказує на задовільну збіжність результатів при застосуванні більш економічно доступного метода дослідження – ШПТ. Без сумніву, ШПТ не володіють такою високою селективністю алергодіагностики, проте, за сумарним результатом є достатньо надійними, що ще раз підкреслює їх багаторічну значущість як способу первинної діагностики сенсibiliзації організму, а також економічну вигоду для пацієнта. Уточнення за молекулярним профілем може здійснюватися в подальшому за вибірковим принципом, особливо для пацієнтів з полісенсibiliзацією чи прихованою сенсibiliзацією, а також як високоточний, персоналізований метод для вибору АСІТ і прогнозу її ефективності.

Для визначення профілю сенсibiliзації до КДП були отримані дані 16309 жителів з 16 регіонів України, котрі пройшли діагностику алергії за допомогою молекулярного тесту ALEX2. Пацієнти проживали в усіх географічних регіонах України – Лісовій, Лісостеповій та Степовій зонах. Найбільше протестованих

пацієнтів, 19,62 %, проживали у столиці України м. Києві (Лісова зона), 14, 48 % – у м. Одесі, 7,7 % – у м. Харкові (Степова зона), 7, 55 % – у Дніпрі (Лісостеп).

Після первинної оцінки отриманої бази даних за географічною приналежністю та віком пацієнтів, до подальшого аналізу були включені дані 10651 осіб, регіон проживання та вік яких можна було встановити достеменно. Серед пацієнтів було 6163 (57,86 %) дитини, віком до 18 років та 4488 дорослих (42, 14 %). З включених у дослідження пацієнтів сенсibilізацію до алергенів кліщів домашнього пилу мали 2875 осіб, що становило 27% проаналізованої вибірки. Серед них 1993 (69,32%) дитини та 882 (30,68 %) дорослих.

В профілях продіагностованих пацієнтів переважала сенсibilізація до алергену Der f 2. Вона спостерігалася або окремо, або у поєднанні з сенсibilізацією до інших алергенних молекул у 2106 або у 73,25 % пацієнтів, чутливих до алергенів КДП. Чутливість до алергену Der p 2 – моно- або у поєднанні з сенсibilізацією до інших алергенів, – спостерігалася у практично такої ж кількості пацієнтів – 2073 (72,10 %). Сенсibilізація до алергенів - Der p 23 була виявлена у 1602 (55,72 %) пацієнтів, Der p 21 -у 786 (27,34 %), Der p 5 – 818 (28,45 %), Der p 7 – у 649 (22,57 %) пацієнтів. Найменша кількість пацієнтів мала сенсibilізацію до наступних алергенів: Der p 20 – 234 пацієнта (8,14 %), Der p 10 – 177 (6,16 %), Der p 11 – 16 пацієнтів (0,56 %).

Серед пацієнтів обох вікових груп найчастіше була виявлена одночасна сенсibilізація до Der f 2 та Der p 2, яка спостерігалася у 12,52 % обстежених. У 9,22% пацієнтів спостерігалась одночасна сенсibilізація до п'яти молекул – алергенів групи 1 та групи 2: Der f 1, Der p 1, Der f 2, Der p 2, та до перитрофіноподібного білка Der p 23. У 7,72 % пацієнтів була виявлена одночасна сенсibilізація до всіх мажорних молекулярних компонентів кліщів, а саме: Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Der p 21, Der p 23, Der p 5, Der p 7. У 6,33% пацієнтів спостерігалася моносенсibilізація до Der p 23, і це була найпоширеніша моносенсibilізація серед пацієнтів всіх вікових груп. У групі дорослих моносенсibilізація до Der p 23 реєструвалась у 8,5 % пацієнтів. Наступною за

поширеністю була моносенсibilізація до Der p 20, але за частотою реєстрації вона була лише десятою і зустрічалася у 2,68 % пацієнтів.

У розрізі регіонів найчастіше реєструвалася одночасна сенсibilізація до Der f 2 та Der p 2. Вона спостерігалась у 14 регіонах з 16 обстежених. У двох регіонах західної України (Закарпатська та Хмельницька області) найбільш частою була сенсibilізація до Der p 23. В цілому серед населення України, а також окремо серед дорослих і серед дітей, найчастіше зустрічалась сенсibilізація до алергенів групи 2 – Der f 2 та Der p 2. Наступною за частотою прояву була полісенсibilізація до алергенів груп 1 та 2 та до Der p 23, а пацієнти, що мають сенсibilізацію до Der p 5, 7, 20, 21 зустрічаються доволі рідко. Однак, відмічені регіони України, в яких найпоширенішою є сенсibilізація до алергену Der p 23.

Подальші дослідження проводили пацієнтам із сенсibilізацією до КДП, які були розподілені на групи: 1 група - пацієнти з IgE-залежною формою АР з рівнем загального IgE > 100kU/L (n=30 осіб); 2 група - пацієнти з IgE-незалежною формою АР з рівнем загального IgE < 100kU/L (n=30 осіб). До контрольної групи увійшло 20 практично здорових осіб. Критеріями включення пацієнтів у дослідження були: наявність симптомів специфічних для АР; наявність сенсibilізації до кліщів домашнього пилу *D. pteronyssinus* та *D. farinae* за результатами шкірних тестів та результатами специфічних IgE в сироватці крові до екстрактів кліщів домашнього пилу та їх компонентів (*Der p* 1, 2) і (*Der f* 1, 2) відповідно; відсутність інших алергічних патологій та порушень носоглотки; вік пацієнтів 20-60 років; добровільна згода пацієнта на участь в дослідженні.

Критеріями виключення були: хронічний риносинусит, наявність поліпів носа, неалергічний (інфекційний) риніт, вік молодше 20 років і старше 60 років, вагітність.

Вік обстежених складав  $28,6 \pm 2,4$  років, серед яких було 49 (43,7%) жінок і 63 (56,3%) чоловіків. Всім пацієнтам виконані клінічні, загальні лабораторні, інструментальні, цитологічні та специфічні алергологічні дослідження. Клінічний

діагноз АР та/або бронхіальна астма (БА) визначені за критеріями ARIA (2016), GINA (2016-2017).

Усім пацієнтам проводили АСІТ алергенним екстрактом Alxoid (Immunotek, Іспанія). Оцінку ефективності АСІТ проводили за допомогою оцінки клінічних симптомів із використання візуально аналогової шкали валідності (ВАШ), кількість Т-регуляторних лімфоцитів та синтез ІЛ-10 і TGF- $\beta$  оцінювали в динаміці лікування через 6, 12, 24, 36 місяців.

При первинному зверненні та після проведеного лікування усім пацієнтам проводили оцінку стану клітинної імунної відповіді за визначенням кількості лімфоцитів крові, таких як: CD3+, CD4+, CD8+, CD16+56+, CD19+, CD69+, CD3+HLA-DR, CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> (Т-регуляторних лімфоцитів). Визначення функціональної активності клітин Т-хелперів І типу проводили за продукцією ІЛ-2 і IFN- $\gamma$ ; Т-хелперів ІІ типу - за продукцією ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13; а також Т-регуляторних лімфоцитів за їх здатністю продукувати ІЛ-10 і TGF- $\beta$ . Оцінку цитокінпродукуючої активності мононуклеарних клітин проводили *in vivo* та *in vitro*.

Виявлено, що у пацієнтів із ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формою АР відсутні відмінності за клінічним перебігом та профілем сенсibiliзації до КДП, однак виявлені відмінності за станом системного імунітету. На основі вивчення популяційного складу лімфоцитів встановлено порушення Т-регуляторної ланки у пацієнтів з ІgЕ-залежною формою АР. Встановлено зниження кількості CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> Т регуляторних лімфоцитів ( $p < 0,05$ ); лише у групі осіб з ІgЕ-залежною формою АР.

На підставі проведеного поглибленого дослідження рівнів продукції про- та протизапальних цитокінів отримано нові дані щодо характеру патогенетичних змін і встановлено їх значення у розвитку алергічного запалення. У пацієнтів з ІgЕ-залежною та ІgЕ-незалежною формою АР з сенсibiliзацією до КДП виявлено дисбаланс між функціональною активністю Th1 і Th2 лімфоцитів. Для пацієнтів з ІgЕ-залежною формою АР характерним було зниження рівня Th1 цитокінів ІЛ-2

( $p < 0,05$ ) і  $\gamma$ -IFN ( $p < 0,05$ ), підвищення рівня Th2 цитокінів - IL4 ( $p < 0,05$ ), IL5 ( $p < 0,05$ ) та IL13 ( $p < 0,05$ ), та зниження Treg цитокінів - IL-10 ( $p < 0,05$ ) і TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ). Для пацієнтів з IgE-незалежною формою АР характерним було лише підвищення рівня IL-13 ( $p < 0,05$ ). Дослідження функціональної активності Th1 і Th2 лімфоцитів в умовах *in vitro* показали відмінність між функціональною активністю Th1 і Th2 лімфоцитів у групах пацієнтів. У групі пацієнтів з IgE-залежною формою визначено зниження функціональної активності Th1 лімфоцитів, посилення функції Th2 лімфоцитів ( $p < 0,05$ ) та зниження активності регуляторних ( $p < 0,05$ ) лімфоцитів, що не спостерігали в групі пацієнтів IgE-незалежною формою АР.

Застосування АСІТ показало точність персоніфікованого вибору алерговакцини на підставі молекулярних досліджень і високу клінічну ефективність у пацієнтів з IgE-залежною формою АР, що підтверджувалось критеріями візуально аналогової шкали валідності (ВАШ) вже через 6 місяців після лікування. Тоді як у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР ефективність АСІТ за шкалою ВАШ була нижчою.

Показано, що застосування АСІТ призводить до індукції Т-регуляторних лімфоцитів, що веде до пригнічення алергічної імунної відповіді. Було показано, що переключення імунної відповіді під час АСІТ відбувається за рахунок пригнічення Th2-імунної відповіді завдяки продукції TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ) на ранніх етапах АСІТ та IL-10 ( $p < 0,05$ ) на більш пізньому етапі. Таке пригнічення призводить до зниження рівня Th2 цитокінів - IL4 ( $p < 0,05$ ), IL5 ( $p < 0,05$ ), IL13, які приймають участь в інгібуванні Th1. Хоча Т-регуляторні лімфоцити з IL-10 володіють опосередкованою супресивною дією пригнічуючи розвиток алергії, однак необхідні ще дослідження, які б підтвердили в подальшому потенційні біомаркери лікувальної ефективності і для інших видів АСІТ.

*Наукова новизна отриманих результатів* полягає у встановленні популяційного характеру сенсibilізації до КДП на території України. Виявлено,

що основними сенсibiliзуючими молекулами КДП серед дорослих в нашому географічному регіоні є Der p 2 і Der f 2.

Доведена ефективність застосування *in vitro* та *in vivo* методів алергодіагностики, який вказує на задовільну збіжність результатів шкірних прик-тестів і молекулярної алергодіагностики на основі тесту ALEX. Запропоновано персоніфікований підхід для проведення АСІТ, базуючись на визначені профілю сенсibiliзації пацієнта.

Встановлено системні порушення стану імунної системи у пацієнтів IgE-залежною формою АР, зокрема: підвищення кількості Т-лімфоцитів хелперів, зниження НК-лімфоцитів та кількості Т-регуляторних лімфоцитів. Виявлено дисбаланс між Th1/Th2-лімфоцитами в сторону Th2 лімфоцитів, за рахунок посилення синтезу цитокінів IL-4, IL-5, IL-13 та зниженням IL-10 і TGF- $\beta$ . Посилення спонтанної та індукованої продукції цитокінів IL-4, IL-5, IL-13 підтверджена в умовах *in vitro*.

Продемонстровано, що системні порушення стану імунної системи у пацієнтів IgE-залежною формою АР, зокрема: підвищення кількості Т-лімфоцитів хелперів, зниження НК-лімфоцитів та кількості Т-регуляторних лімфоцитів. Виявлено дисбаланс між Th1/Th2-лімфоцитами в сторону Th2 лімфоцитів, за рахунок посилення синтезу цитокінів IL-4, IL-5, IL-13 та зниженням IL-10 і TGF- $\beta$ . Посилення спонтанної та індукованої продукції цитокінів IL-4, IL-5, IL-13 підтверджено в умовах *in vitro*.

Встановлено, що у пацієнтів з сенсibiliзацією до КДП з IgE-залежною формою АР, АСІТ сприяє активації функції Т-регуляторних лімфоцитів. Це проявляється підвищенням синтезу TGF- $\beta$  та IL-10 та переключенням імунної відповіді в бік Th1 лімфоцитів, що проявлялось посиленням продукції IL-2 і IFN- $\gamma$ , та зниженням продукції IL4, IL5 і IL13.

*Практичне значення отриманих результатів* полягає у тому, що на підставі отриманих результатів визначено особливості клінічних проявів та перебігу АР у



пацієнтів з сенсibiliзацією до КДП з ІgЕ-залежною та ІgЕ-незалежною формою АР.

Рекомендовано застосування молекулярної діагностики алергії для визначення профілю сенсibiliзації, особливо для пацієнтів з полісенсibiliзацією чи прихованою сенсibiliзацією, а також як високоточний, персоніфікований метод для вибору АСИТ і прогнозу її ефективності.

Встановлений характер популяційної сенсibiliзації до КДП в Україні, що, в цілому, є хорошим прогностичним маркером ефективності АІТ, позаяк сучасні екстракти для її проведення націлені на вироблення толерантності, здебільшого, до алергенів груп 1 та 2, і, меншою мірою, до Der p 23.

Рекомендований моніторинг показників Т-регуляторних лімфоцитів: ІL-10 та TGF- $\beta$  для прогнозування ефективності АСИТ.

Обґрунтовано клінічну ефективність застосування АСИТ, котра продемонструвала точність персоніфікованого вибору алерговакцини на підставі молекулярних досліджень і високу клінічну ефективність у пацієнтів з ІgЕ-незалежною формою АР, що підтвердилось показниками ВАШ.

*Ключові слова: алергічний риніт, КДП, цитокіни, регуляторні Т-лімфоцити, алергенспецифічна імунотерапія.*

## ABSTRACT

***Yuriev S.D. Immunological features of pathogenesis, diagnosis and treatment of perennial rhinitis in patients with sensitization to house dust mites. – Qualifying scientific work as a manuscript.***

Thesis is submitted for obtaining the Doctor of Philosophy degree in Health Care, specialty 222 – Medicine. – O. O. Bogomolets National Medical University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2023.

*The purpose of the study is to study the features of the clinical course, the functional state of the immune system, and the effectiveness of allergen-specific therapy*

(ASIT) in patients with IgE-dependent and IgE-independent forms of allergic rhinitis (AR) caused by sensitization to house dust mites (HDM).

In the dissertation work, the molecular profile of sensitization to HDM was determined, and a comparative analysis of alternative methods of assessing hypersensitivity in people with an allergy to HDM was carried out. The features of the immune response and approaches to treatment in patients with different pathogenetic mechanisms of AR development – IgE-dependent and IgE-independent forms – have been determined. The effectiveness of the use of ASIT in patients with IgE-dependent form of AR has been scientifically substantiated and proven, and the accuracy of the personalized approach to its use has been proven.

During the study, allergy pathology was verified in 112 patients according to the following clinical signs: 85 (75.9%) patients had complaints of periodic/constant sneezing, 77 (68.7%) - periodic rhinorrhea, 84 (75, 0%) – nasal congestion, 74 (66.1%) – itchy nose/eyes, 54 (48.2%) – rhinoconjunctivitis, 44 (39.3%) – dry skin, 29 ( 26.9%) – erythematous-squamous rashes on the skin of the upper limbs, upper chest, neck, etc. with itching, 25 (22.3%) – recurrent broncho-obstructive syndrome (BOS). Mild eosinophilia (from 0.6 to 1.5 G/l) was detected in the general blood test (CBC) in 22 (19.6%) persons. An increased number of eosinophils (from 17% to 75% in the field of view) was found in the smear-print of the nasal mucosa in 52 (46.4%) people.

Persistent (year-round) AR, 31 (27.7%) people and intermittent (seasonal) AR, 29 (25.8%) people were most often diagnosed among the examined patients.

Aggravating family allergic anamnesis regarding the development of AZ was recorded in 61 persons (54.5%): in both parents in 4 (6.6%) persons, in the father – 16 (26.2%), in the mother – in 15 (24, 6%), close relatives – 26 (42.6%).

Diagnosis of allergy to HDM, was carried out using skin prick tests (SPT) and specific IgE. When evaluating the effectiveness of the application of SPT in comparison with modern methods of molecular allergy diagnostics using the ALEX2 test. A comparative analysis of *in vitro* and *in vivo* methods of allergy diagnosis indicates a satisfactory convergence of results when using a more economically available research

method - SPT. Undoubtedly, SPTs do not have such a high selectivity of allergy diagnosis, but the overall result is quite reliable, which once again emphasizes their long-term significance as a method of primary diagnosis of sensitization of the body, as well as economic benefit for the patient. Refinement by molecular profiling can be carried out further on a selective basis, especially for patients with polysensitization or hidden sensitization, and as a highly accurate, personalized method for the selection of ACIT and the prediction of its effectiveness.

To determine the profile of sensitization to house dust mites, data were obtained from 16,309 residents of 16 regions of Ukraine who underwent allergy diagnosis using the ALEX2 molecular test. Patients lived in all geographical regions of Ukraine - Forest, Forest-Steppe and Steppe zones. The largest number of tested patients, 19.62%, lived in the capital of Ukraine, Kyiv (Forest zone), 14.48% - in Odesa, 7.7% - in Kharkiv (Steppe zone), 7.55% - in Dnipro (Lisostep).

After the initial assessment of the obtained database by geographic affiliation and age of patients, the data of 10,651 people, whose region of residence and age could be reliably established, were included in the further analysis. Among them were 6163 (57.86%) children under the age of 18 and 4488 adults (42.14%). Of the patients included in the study, 2875 had sensitization to house dust mite allergens, which was 27% of the analyzed sample. Among them are 1,993 (69.32%) children and 882 (30.68%) adults.

The profiles of diagnosed patients were dominated by sensitization to Der f 2 allergen. It was observed either alone or in combination with sensitization to other allergenic molecules in 2106 or in 73.25% of patients sensitive to HDM allergens. Sensitivity to the allergen Der r 2 - mono- or in combination with sensitization to other allergens - was observed in almost the same number of patients - 2073 (72.10%). Sensitization to allergens - Der p 23 was detected in 1602 (55.72%) patients, Der p 21 - in 786 (27.34 %), Der p 5 - 818 (28.45 %), Der p 7 - in 649 (22.57%) of patients. The smallest number of patients had sensitization to the following allergens: Der p 20 – 234 patients (8.14%), Der p 10 – 177 (6.16%), Der p 11 – 16 patients (0.56%).

Among patients of both age groups, simultaneous sensitization to Der f 2 and Der p 2 was most often detected, which was observed in 12.52% of the examined. In 9.22% of patients, simultaneous sensitization to up to five molecules - group 1 and group 2 allergens Der f 1, Der p 1, Der f 2, Der p 2 and to the peritrophin-like protein Der p 23 was observed. In 7.72 % patients, simultaneous sensitization to all major molecular components of ticks Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Der p 21, Der p 23, Der p 5, Der p 7 was observed. In 6.33% of patients, monosensitization to Der p 23. This was the most common monosensitization among patients of all age groups. In the group of adults, monosensitization to Der p 23 was registered in 8.5% of patients. The next most common was monosensitization to Der p 20. But in terms of frequency of registration, it was only the tenth and occurred in 2.68% of patients.

In terms of regions, simultaneous sensitization to Der f 2 and Der p 2 was most often registered. It was observed in 14 regions out of 16 examined. In two regions of western Ukraine (Zakarpattia and Khmelnytskyi regions) sensitization to Der p 23 was most common. In general, among the population of Ukraine, as well as separately among adults and children, sensitization to group 2 allergens – Der f 2 and Der p 2 – was most common. The next most frequent manifestation was polysensitization to allergens of groups 1 and 2 and to Der p 23, and patients with sensitization to Der p 5, 7, 20, 21 are quite rare. However, the regions of Ukraine where sensitization to the Der p 23 allergen is most common have been noted.

From the examined group, further studies were conducted in patients with sensitization to HDM, who were divided into groups: 1 group - patients with an IgE-dependent form of AR with a level of total IgE > 100 kU/L (n=30 people); Group 2 - patients with IgE-independent form of AR with a level of total IgE < 100 kU/L (n=30 people). The control group included 20 practically healthy people. The criteria for including patients in the study were: the presence of symptoms specific to AR; the presence of sensitization to house dust mites *D. pteronyssinus* and *D. farinae* according to the results of skin tests and the results of specific IgE in blood serum to extracts of house dust mites and their components (Der p 1, 2) and (Der f 1, 2), respectively;

absence of other allergic pathologies and disorders of the nasopharynx; age of patients 20-60 years; voluntary consent of the patient to participate in the study.

Exclusion criteria were: chronic rhinosinusitis, presence of nasal polyps, non-allergic (infectious) rhinitis, age younger than 20 years and older than 60 years. pregnancy.

The age of the examinees was  $28.6 \pm 2.4$  years, among whom there were 49 (43.7%) women and 63 (56.3%) men. Clinical, general laboratory, instrumental, cytological and specific allergological studies were performed on all patients. The clinical diagnosis of allergic rhinitis (AR) and/or bronchial asthma (BA) is determined according to the criteria of ARIA (2016), GINA (2016-2017).

All patients underwent ASIT with Alxoid allergen extract (Inmunotek, Spain). The effectiveness of ASIT was evaluated by evaluating clinical symptoms using the validity and reliability of Visual Analogue Scale (VAS), the number of T-regulatory lymphocytes and the synthesis of IL-10 and TGF- $\beta$  were evaluated in the dynamics of treatment after 6, 12, 24, 36 months.

At the initial consultation and after treatment, all patients were assessed for the state of the cellular immune response by determining the number of blood lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+, CD16+56+, CD19+, CD69+, CD3+HLA-DR, CD3+CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> (T-regulatory lymphocytes). Determination of the functional activity of type I T-helper cells was carried out by the production of IL-2 and IFN- $\gamma$ ; T-helpers of type II - by the production of IL-4, IL-5, IL-13; and T-regulatory lymphocytes by their ability to produce IL-10 and TGF- $\beta$ . Cytokine-producing activity of mononuclear cells was assessed under *in vivo* and *in vitro* conditions.

On the basis of the conducted in-depth study of the production levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, new data were obtained on the nature of pathogenetic changes and their significance in the development of allergic inflammation was established. An imbalance between the functional activity of Th1 and Th2 lymphocytes was found in patients with IgE-dependent and IgE-independent forms of AR with sensitization to HDM. A decrease in the level of Th1 cytokines IL-2 ( $p < 0.05$ ) and  $\square$ -

IFN ( $p < 0.05$ ), an increase in the level of Th2 cytokines - IL4 ( $p < 0.05$ ) was characteristic for patients with IgE-dependent form of AR. IL5 ( $p < 0.05$ ) and IL13 ( $p < 0.05$ ), and a decrease in Treg cytokines - IL-10 ( $p < 0.05$ ) and TGF- $\beta$  ( $p < 0.05$ ). For patients with an IgE-independent form of AR, only an increase in the level of IL-13 was characteristic ( $p < 0.05$ ). Studies of the functional activity of Th1 and Th2 lymphocytes in vitro showed a difference between the functional activity of Th1 and Th2 lymphocytes in groups of patients. In the group of patients with the IgE-dependent form, a decrease in the functional activity of Th1 lymphocytes, an increase in the function of Th2 lymphocytes ( $p < 0.05$ ) and a decrease in the activity of regulatory ( $p < 0.05$ ) lymphocytes were determined, which were not observed in the group of patients with an IgE-independent form of AR .

The use of ASIT showed the accuracy of personalized selection of an allergy vaccine based on molecular studies and high clinical efficiency in patients with IgE-dependent form of AR, which was confirmed by VAS criteria already 6 months after treatment. Whereas in patients with an IgE-independent form of AR, the effectiveness of ASIT according to the VAS scale was lower.

It has been shown that the use of ASIT leads to the induction of T-regulatory lymphocytes, which leads to suppression of the allergic immune response. It was shown that the switching of the immune response during ASIT occurs ( $p < 0.05$ ) due to the suppression of the Th2 immune response due to the production of TGF- $\beta$  ( $p < 0.05$ ) in the early stages of ACIT and IL-10 ( $p < 0.05$ ) at a later stage. Such suppression leads to a decrease in the level of Th2 cytokines - IL4 ( $p < 0.05$ ), IL5 ( $p < 0.05$ ), IL13, which take part in Th1 inhibition. Although T regulatory lymphocytes with IL-10-mediated suppressive effect represent a promising basis of the target for the treatment of allergies, further studies are needed to further confirm the potential biomarkers of therapeutic efficacy for other types of ASIT.

*The scientific novelty* of the obtained results lies in the establishment of population-based sensitization to the HDM on the territory of Ukraine. It was found that

the main sensitizing molecules of HDM among adults in our geographical region are Der p 2 and Der f 2.

The effectiveness of *in vitro* and *in vivo* allergy diagnosis methods has been proven, which indicates a satisfactory convergence of the results of skin prick tests and molecular allergy diagnosis based on the ALEX test. A personalized approach for conducting ASIT based on the determined profile of the patient's sensitization is proposed.

Systemic disorders of the state of the immune system were established in patients with IgE-dependent form of AR, in particular, an increase in the number of helper T-lymphocytes, a decrease in NK-lymphocytes and T-regulatory lymphocytes. An imbalance between Th1/Th2-lymphocytes in favor of Th2-lymphocytes was revealed, caused by an increase in the synthesis of cytokines IL-4, IL-5, IL-13 and a decrease in IL-10 and TGF- $\beta$ . The enhancement of spontaneous and induced production of IL-4, IL-5, and IL-13 cytokines was confirmed *in vitro*.

It has been demonstrated that systemic disorders of the immune system in patients with an IgE-dependent form of AR, in particular, an increase in the number of helper T-lymphocytes, a decrease in NK-lymphocytes and the number of T-regulatory lymphocytes. An imbalance between Th1/Th2-lymphocytes in the direction of Th2 lymphocytes was revealed, due to increased synthesis of cytokines IL-4, IL-5, IL-13 and a decrease in IL-10 and TGF- $\beta$ . Enhancement of spontaneous and induced production of cytokines IL-4, IL-5, IL-13 was confirmed *in vitro*.

It was established that in patients with sensitization to HDM with an IgE-dependent form of AR, ACIT contributes to the activation of the function of T-regulatory lymphocytes. This is manifested by an increase in the synthesis of TGF- $\beta$  and IL-10 and a switch of the immune response towards Th1 lymphocytes, which was manifested by an increase in the production of IL-2 and IFN- $\gamma$ , and a decrease in the production of IL4, IL5 and IL13.

*The practical significance* of the obtained results is that, on the basis of the obtained results, the peculiarities of the clinical manifestations and course of AR in

patients with sensitization to HDM with IgE-dependent and IgE-independent forms of AR were determined.

The use of molecular allergy diagnostics is recommended to determine the sensitization profile, especially for patients with polysensitization or hidden sensitization, as well as as a highly accurate, personalized method for selecting ASIT and predicting its effectiveness.

The established nature of population sensitization to HDM in Ukraine, in general, is a good prognostic marker of the effectiveness of AIT, since modern extracts for its implementation are aimed at producing tolerance, mostly, to allergens of groups 1 and 2, and, to a lesser extent, to Der p 23.

Recommended monitoring of indicators of T-regulatory lymphocytes, IL-10, TGF- $\beta$  to predict the effectiveness of ASIT.

The clinical effectiveness of the use of ASIT is substantiated, the accuracy of the personalized selection of an allergy vaccine based on molecular studies and high clinical effectiveness in patients with IgE-independent form of AR, which was confirmed by the criteria of VASH, have been demonstrated.

*Key words: allergic rhinitis, house dust mites (HDM), cytokines, regulatory T-lymphocytes, allergen-specific immunotherapy.*



## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Yuriev, S. (2020). Assessment of the cytokine profile in patients with allergic rhinitis caused by sensitization to house dust mite. *Immunology and Allergy: Science and Practice*, (1), 25-31. <https://doi.org/10.37321/immunology.2020.01-04>
2. Marushko, I., Halushko, B., Yuriev, S., Nyshchak, T., & Moskovento, E. (2021). CLINICAL SIGNIFICANCE OF IgG ANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF ALLERGIC CONDITIONS AND CONTROL OF ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY. Review. *Medical Science of Ukraine (MSU)*, 17(4). <https://doi.org/10.32345/2664-4738.4.2021.18>
3. Юр'єв С. Д. Алгоритм відбору пацієнтів з алергічним ринітом і сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу для проведення алерген-імунотерапії / С. Д. Юр'єв, А. І. Курченко, Г. В. Федорук // Імунологія та алергологія: наука і практика. - 2019. - № 1. - С. 46-53. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_1\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_1_7).
4. Юр'єв, С. Д., Курченко А, І. (2022). Особливості імунної відповіді у пацієнтів з цілорічним алергічним ринітом та сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу. doi: 10.31655/2307-3373-2022-1-2-35-42
5. Зубченко С.О., Гайдучок І.Г., Юр'єв С.Д., Чопяк В.В. (2022) Оцінка клінічної ефективності алергенімунотерапії у пацієнтів з алергічними хворобами. *Імунологія та алергологія: Наука і практика*. 3-4'2020 doi:10.37321/immunology.2020.3-4-08

### Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації у зарубіжних спеціалізованих виданнях

6. Rodinkova VV, Yuriev SD, Kryvopustova MV, Mokin VB, Kryzhanovskiy YM and Kurchenko AI (2022) Molecular Profile Sensitization to House Dust Mites as an Important Aspect for Predicting the Efficiency of Allergen

Immunotherapy. Front. Immunol. 13:848616. doi:  
10.3389/fimmu.2022.848616

7. Yuriev S, Rodinkova V, Mokin V, Varchuk I, Sharikadze O, Marushko Y, Halushko B, Kurchenko A. Molecular sensitization pattern to house dust mites is formed from the first years of life and includes group 1, 2, Der p 23, Der p 5, Der p 7 and Der p 21 allergens. Clin Mol Allergy. 2023 Feb 3;21(1):1. doi: 10.1186/s12948-022-00182-z. PMID: 36737770; PMCID: PMC9898923.

### **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

8. Yuriev, S., et al. "DIAGNOSTIC FEATURES OF HOUSE DUST MITE SENSITIZATION." ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY. Vol. 125. No. 5. STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, NY 10169 USA: ELSEVIER SCIENCE INC, 2020.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.08.081>
9. Yuriev S. et al. IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH IGE DEPENDENT AND IGE INDEPENDENT DUST MITE ALLERGIC RHINITIS //Annals of Allergy, Asthma & Immunology. – 2022. – Т. 129. – №. 5. – С. S73.  
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.08.712>
10. Yuriev, S. D. "Prevalence of sensitization to house dust mite allergens in adults." ALLERGY. Vol. 76. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2021.

### **Наукові праці, які додатково відображують наукові результати дисертації**

11. Okhotnikova ON, Sharikadze OV, Yuriev SD (2018) Primary Prevention of Allergic Diseases: Dreams or Reality? J Tradit Med Clin Natur 7: 260. DOI: 10.4172/2573-4555.1000260.
12. Marushko YuV, Halushko BL, Yuriev CD, Hyshchak TV. (2022). Sensitization profile to house dust mite allergens in children with allergies in Ukraine. Modern Pediatrics. Ukraine. 6(126): 30-36. doi

10.15574/SP.2022.126.30. Article received: Jul 12, 2022. Accepted for publication: Oct 20, 2022.

13.Зубченко С., Чоп'як В., Колінковський О., Юр'єв С., Шарікадзе О. Порівняльний аналіз альтернативних методів діагностики профілю сенсibiliзації пацієнтів західного регіону України. Імунологія та алергологія: наука і практика. - 2019. - № 3. - С. 45-59. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_3\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_3_7).

## ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ .....	2
ЗМІСТ.....	8
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	25
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ....	32
Алергічний риніт: імунологічні особливості патогенезу, клініки, діагностики та алергенспецифічної імунотерапії. ....	32
1.1 Алергічний риніт викликаний кліщами домашнього пилу – клініка, патогенетичні механізми розвитку.....	32
1.2. Діагностика алергії до кліщів домашнього пилу.....	37
1.3. Алергенспецифічна імунотерапія в лікуванні алергії до кліщів домашнього пилу. ....	43
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
2.1 Загальна характеристика клінічних спостережень.....	47
2.1.1. Методика проведення шкірних прик-тестів.....	51
2.1.2. Методика проведення алерген специфічної імунотерапії...	52
2.1.3. Оцінка клінічної ефективності лікування .....	53
2.2 Лабораторні методи дослідження.....	54
2.2.1. Визначення рівня загального IgE та рівня специфічних IgE до компонентів алергенів (sIgE) .....	54
2.2.2. Визначення концентрації цитокінів в сироватці крові IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF-β, IFN-γ.....	55
2.2.3.Визначення спонтанної та індукованої продукції цитокінів мононуклеарами периферичної крові <i>in vitro</i> .....	55
2.2.4. Визначення популяцій і субпопуляцій лімфоцитів .....	56
2.2.5. Статистична обробка результатів.....	57
Розділ 3. КЛІНІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ДІАГНОСТИКА АЛЕРГІЇ ДО	

КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ У ПАЦІЄНІВ З АЛЕРГІЧНИМ РИНИТОМ .....	58
3.1. Клінічні прояви алергопатології у обстежених осіб.....	58
3.2. Порівняльний аналіз <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> методів алергодіагностики алергії у обстежених осіб.....	60
3.3. Визначення молекулярного профілю сенсibilізації до алергенів кліщів домашнього пилу .....	65
3.4. Порівняльний аналіз <i>in vitro</i> та <i>in vivo</i> методів алергодіагностики алергії у обстежених осіб із алергією до кліщів домашнього пилу з IgE-залежною та IgE-незалежною формою AP.....	72
Розділ 4. ОЦІНКА СТАНУ СИСТЕМНОЇ КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ПАЦІЄНТІВ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ ІЗ СЕНСIBILІЗАЦІЄЮ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ .....	76
4.1. Стан системної клітинної імунної відповіді у пацієнтів на алергічний риніт із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.....	76
4.2. Оцінка цитокінового профілю у пацієнтів на алергічний риніт викликаний сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.....	82
4.3. Функціональна активність <i>in vitro</i> клітин імунної системи периферичної крові у пацієнтів на алергічний риніт, викликаний сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу .....	89
Розділ 5. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ АЛЕРГЕНСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ У ПАЦІЄНТІВ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ З СЕНСIBILІЗАЦІЄЮ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ.....	100
5.1. Оцінка клінічної ефективності алерген специфічної імунотерапії у пацієнтів із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.....	100
5.2. Стан системної клітинної імунної відповіді у пацієнтів на алергічний риніт із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу	

після проведення алерген специфічної імунотерапії.....	110
5.3 Оцінка цитокінового профілю у пацієнтів на алергічний риніт викликаний сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу до та після проведення АСІТ.....	118
5.4. Функціональна активність <i>in vitro</i> клітин імунної системи периферичної крові у пацієнтів на алергічний риніт, викликаний сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу АСІТ.....	125
Розділ 6. АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	134
ВИСНОВКИ.....	157
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	160
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	161

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ	– антиген
АД	– атопічний дерматит
АЗ	– алергічне захворювання
АР	– алергічний риніт
АСІТ	– алерген специфічна імунотерапія
БА	– бронхіальна астма
ВЛК	– вроджені лімфоїдні клітини
ІС	– імунна система
КДП	– КДП
ALEX	– мультикомпонентний метод алергодіагностики
АРС	– антигенпрезентуючі клітини
CD	– кластери диференціації клітин
CRD	– компонентна діагностика
FOXP3	– транскрипційний фактор
Der p 1	– головний білок кліща домашнього пилу <i>D. pteronissimus</i>
Der p 2	– головний білок кліща домашнього пилу <i>D. pteronissimus</i>
Der m 1	– алерген кліща <i>Dermatophagoides microceras</i>
Eur m 1	– алерген кліща <i>Euroglyphus maynei</i> .
ІІ	– інтерлейкін
IgE	– імуноглобуліни E
IgG4	– імуноглобуліни G4
ІФН-γ	– інтерферон гама
ARIA	– Керівництво «Алергічний риніт та його вплив на астму»
MAD	– молекулярна алергодіагностика
NK	– натуральні кілерні клітини

PAMPs	– патоген-асоційовані молекулярні патерни
SCIT	– субкутанна імунотерапія
SLIT	– сублінгвальна імунотерапія
Th 1	– Т-хелпери першого типу
Th 2	– Т-хелпери другого типу
Th 9	– Т-хелпери дев'ятого типу
TGF- $\beta$	– трансформуючий фактор росту типу $\beta$
Tr1	– індукцибельні Т-регуляторні клітини
Treg	– Т-регуляторні клітини



## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Алергічний риніт (АР) - одне з найпоширеніших хронічних запальних захворювань слизової оболонки носа і пазух [1,2]. Сучасна концепція патогенезу АР ґрунтується на визнанні провідної ролі ІgЕ-опосередкованих алергічних реакцій у відповідь на дію «причинного» алергену з подальшим формуванням алергічного запалення і гіперактивності слизової оболонки носа [1,3].

За даними ВООЗ на алергічний риніт страждає до 30% населення і захворювання продовжує поширюватися [4]. Найчастіше при АР проявляються супутні захворювання, такі як алергічний кон'юнктивіт та інші порушення з боку дихальної системи, зокрема риносинусит і астма. Зазвичай, цей процес обумовлений алергенами, джерелом яких є пилок рослин, домашні тварини і продукти життєдіяльності кліща домашнього пилу. Часті загострення АР значно впливають на якість життя і є проблемою для системи охорони здоров'я, частково через вартість фармакологічного контролю симптомів [2,5]

Нещодавно стало відомо, що адаптивні імунні реакції, що виникають при АР, обумовлені Т-лімфоцитами, зокрема Th2 (що продукують ІL-4, ІL-5 і ІL-13-продукують) і Th9-клітинами (що продукують ІL-9 і ІL-10) і є основними ефекторними Т-клітинами. Ці клітини відіграють істотну роль в індукції інших ефекторних клітин, які викликають запалення, пов'язане з АР, таких як опасисті клітини, базофіли і еозинофіли [6,7].

Алергенспецифічна імунотерапія (АСІТ) алергенами пилку рослин або екстрактами кліща домашнього пилу (КДП), є ефективним методом лікування ІgЕ-опосередкованих алергічних захворювань дихальних шляхів, викликаючи довгострокове поліпшення клінічних показників і імунологічну толерантність. Основні імунологічні механізми АСІТ включають в себе імунну девіацію від

патерну Th2-клітин до Th1-клітин, шляхом блокування продукції антитіл і індукції регуляторної Т-клітини. Більш того, у пацієнтів з АР, клінічно-ефективна АСІТ корелює з імунологічними змінами, як на гуморальному, так і на клітинному рівнях [8,9].

Добре відомо, що алергенспецифічні регуляторні Т-клітини відіграють важливу роль в імунологічній індукції толерантності, що спостерігається під час АСІТ. Вони здатні пригнічувати активацію, проліферацію і ефektorні функції безлічі клітин-мішеней, включаючи стовбурові малодиференційовані клітини, антигенпредставляючі клітини і ефektorні Т-клітини (в основному Th2 і Th9). Регуляторні Т-клітини також синтезують цитокіни, такі як IL-10 і TGF- $\beta$ , які володіють ключовою супресивною активністю [8,9,10,11,12].

Незважаючи на те, що деякі дослідження повідомляють про позитивні клінічні результати під час АСІТ у вигляді збільшення кількості регуляторних Т-клітин, інші дослідження не виявили таких змін кількості. До того ж, багато авторів стверджують, що ефективність в значній мірі пов'язана зі змінами кількості Т-клітин, які продукують IL-10, вираженою супресією Th2-опосередкованої продукції IL-4, що призводить до зниження продукування IgE плазмоцитами [8,9,10,11,12].

Ми припускаємо, що під час АСІТ відбуваються різні механізми регуляції, які впливають на активність алергенспецифічних регуляторних Т-клітин і призводять до супресії Th2-відповіді. Тому ефективність АСІТ може бути обумовлена не тільки збільшенням відсоткової частки алергенспецифічних регуляторних Т-клітин, але і їх підвищеною активністю.

### **Мета і завдання дослідження**

*Мета* – вивчити особливості клінічного перебігу та встановити ефективність АСІТ у пацієнтів АР із сенсibiliзацією до КДП на основі оцінки функціонального стану імунної системи при IgE-залежній і IgE-незалежній формах алергічного риніту.

**Завдання дослідження:**

1. На підставі аналізу даних клінічних, лабораторних та молекулярних методів досліджень, проведених за критеріями ARIA (2016), сформулювати алгоритм відбору пацієнтів з АР із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу для подальшого проведення алергенспецифічної імунотерапії.
2. Визначити особливості клінічного перебігу захворювання у хворих з АР і сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу в процесі проведеної АСИТ з метою прогнозу термінів індукції імунологічної толерантності.
3. Дослідити динаміку зміни імунофенотипових властивостей і складу мононуклеарних клітин периферичної крові у хворих з цілорічним АР і сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу в процесі проведення АСИТ.
4. З'ясувати особливості змін функціональної активності мононуклеарних клітин периферичної крові за продукцією цитокінів в умовах *in vitro* ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13, ІЛ-10, а також ІFN- $\gamma$  і TGF- $\beta$  у хворих з цілорічним АР і сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу в процесі проведення АСИТ.
5. На підставі вивчення впливу алергенспецифічної імунотерапії на клітинний склад мононуклеарів периферичної крові і динаміку функціональної активності клітин за продукцією цитокінів ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13, ІЛ-10, ІЛ-17, а також ІFN-  $\gamma$  і TGF- $\beta$  в умовах *in vitro* у хворих з цілорічним АР і сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу, патогенетично обґрунтувати метод оцінки ефективності проведеного лікування.

**Об'єкт дослідження:** хворі з цілорічним АР і сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.

**Предмет дослідження:** особливості клінічного перебігу АР; функціональний стан імунної системи; діагностична ефективність розробленої схеми молекулярної алергодіагностики і ефективності оцінки лікування АР у хворих з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.

### **Методи дослідження:**

1. Загальноклінічні: скарги, анамнез, загальне обстеження, включаючи виявлення симптомів алергії, огляду слизової порожнини носа
2. Інструментальні – проведення провокаційних алергопроб методом шкірного прик-тестування.
3. Лабораторні – визначення сенсibilізації до алергокомпонентів кліщів домашнього пилу імунохроматографічним методом ALEX-тест; визначення рівня концентрації цитокінів в сироватці крові і культури супернатантів клітин крові методом імуноферментного аналізу; фенотипування лімфоцитів методом проточної цитофлюориметрії.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Вперше запропоновано новий комплексний метод молекулярної алергодіагностики у хворих на цілорічний АР з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу, який базується на технології ALEX, що дозволить підвищити клінічну ефективність проведеної алергенспецифічної імунотерапії.

Вперше проведено вивчення широкого спектру клітинних і гуморальних показників системного імунітету (цитокінів IL-2, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-17, а також IFN- $\gamma$  і TGF- $\beta$ ) у хворих цілорічним ринітом з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу в динаміці проведення АСІТ.

### **Особистий внесок здобувача**

Представлені у роботі матеріали є особистим внеском здобувача у розв'язання питань клінічних проявів алергічного риніту у пацієнтів із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу, визначення особливостей імунологічних порушень, лікування та визначення маркерів ефективності АСІТ. Це дало змогу оптимізувати діагностику, поглибити розуміння розвитку та клінічного перебігу АР та патогенетично обґрунтувати метод оцінки ефективності проведеного лікування. Здобувачем була сформульована мета роботи, поставлені основні завдання, які були відкореговані науковим керівником доктором медичних наук, професором Курченком А.І. та підібрані методи дослідження, які необхідні

для виконання поставлених задач. Зібрана та проаналізована сучасна наукова література за темою дисертації. Проведено у повному обсязі клінічні та імунологічні дослідження за темою дисертації, вивчено ефективність запропонованих методів лікування, здійснено статистичну обробку отриманих результатів, проведено впровадження результатів досліджень у клінічну практику. Сумісно з науковим керівником сформульовано висновки та практичні рекомендації роботи

Персональний внесок дисертанта у всіх опублікованих із співавторами роботах наводиться за текстом дисертації та в авторефераті у списку наукових праць.

#### **Апробація матеріалів дисертації**

1. Yuriev, S., et al. "DIAGNOSTIC FEATURES OF HOUSE DUST MITE SENSITIZATION." ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY. Vol. 125. No. 5. STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, NY 10169 USA: ELSEVIER SCIENCE INC, 2020.  
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.08.081>
2. Yuriev S. et al. IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH IGE DEPENDENT AND IGE INDEPENDENT DUST MITE ALLERGIC RHINITIS //Annals of Allergy, Asthma & Immunology. – 2022. – Т. 129. – №. 5. – С. S73.  
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.08.712>
3. Yuriev, S. D. "Prevalence of sensitization to house dust mite allergens in adults." ALLERGY. Vol. 76. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2021.
4. Виступ на Конгресі Європейської академії алергії та клінічної імунології (EAACI Congress) (Мадрид-Краків, 10-12 червня 2021 р.)
5. Виступ на Конгресі Європейської академії алергії та клінічної імунології (EAACI Congress) (Прага, 1-3 липня 2022 р.)

6. Виступ на Конгресі Європейської академії алергії та клінічної імунології (EAACI Congress) (Гамбург, 9-11 липня 2023 р.)

### **Структура та обсяг дисертації**

Дисертаційна робота викладена на \*\*\* сторінках комп'ютерного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, \* розділів результатів власних досліджень, висновків, практичних рекомендацій та додатків. Список літератури складається з \*\*\* джерел (\*\* друкованих аркушів). Робота ілюстрована \*\* рисунками і \*\* таблицями.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дисертаційна робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики НМУ ім. О.О. Богомольця. НДР «Удосконалити діагностику та лікування алергічних та імунозалежних захворювань на основі вивчення імунологічних та генетичних особливостей асоційованої лімфоїдної тканини», 0119U100457, 2019-2021 рр. (№ держреєстрації НДР 0119U100457).

### **Практичне значення отриманих результатів.**

На підставі отриманих результатів дослідження розроблений та впроваджений в клінічну практику новий комплексний метод молекулярної алергодіагностики і алергенспецифічної імунотерапії у хворих на цілорічний АР з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.

Простота і доступність запропонованої схеми молекулярної алергодіагностики і АСІТ у хворих АР з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу дозволить широко використовувати її в практичній діяльності лікарів різних спеціальностей.

Позаяк виявлений характер сенсibilізації в у різних географічних регіонах України, встановлені закономірності слід враховувати для вибору стратегії АСІТ та для прогнозу її ефективності як у регіональному розрізі, так і у окремих пацієнтів.

Нами встановлено ефективність застосування АСІТ опираючись на імунологічні показники, а також дані сучасних методів точної молекулярної алергодіагностики. Наукова новизна полягає у відборі пацієнтів на АСІТ із можливості прогнозу необхідного лікування із урахуванням імунологічних показників та сенсibilізації до мінорних молекул КДП, а саме Der p 20 та 21, які до цього не визначались в широкій клінічній практиці.

Перед проведенням АСІТ доцільно визначати спектр сенсibilізації до КДП як у пацієнтів з IgE-залежною, так і IgE-незалежною формами АР для виявлення головних і перехреснореактивних (мінорних) молекул. Особливу увагу слід звертати на пацієнтів у яких виявлено сенсibilізацію до Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 20, Der p 21, Der p 23, котра має враховуватися при виборі тактик лікування хворих з алергією до КДП. Пацієнтам з IgE-незалежною формою алергічного риніту та наявною сенсibilізацією до мінорних компонентів КДП Der p10 не призначати АСІТ, котра не призводить до клінічного покращення.

Основними критеріями відбору для ефективного проходження АСІТ є:

- Наявність клінічних симптомів АР
- Встановлений IgE-залежний механізм АР
- Наявність сенсibilізації до головних алергокомпонентів КДП до Der p 1, Der p 2, до Der f 2, Der p f 2.
- Визначено ефективність наступної схеми підшкірної АСІТ: 1 доза – 400 ТО/мл, 2 доза (з інтервалом 7 днів) – 1000 ТО/мл, 3 доза (з інтервалом 7 днів) – 2000 ТО/мл, 4 доза (з інтервалом 7 днів) - 5000 ТО/мл, подальше лікування включало підтримуючу терапію у вигляді 5000 ТО/мл із інтервалом у 30 днів

## РОЗДІЛ І

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Алергічний риніт викликаний кліщами домашнього пилу – клініка, патогенетичні механізми розвитку

Алергічний риніт — це запальний процес слизової оболонки носа викликаний алергенами. Як відомо, не дивлячись на однорідність клінічних проявів, захворювання АР має як мінімум дві описані патогенетичні форми. Це ІgЕ-залежна алергічна форма, яка розвивається на фоні присутності в крові високого рівня загального і алергенспецифічного ІgЕ, і так звана ІgЕ-незалежна форма АР, в патогенезі якої відсутній чіткий механізм розвитку гіперчутливості негайного типу [18, 94, 131].

Відомо, що високий рівень еозинофілії, супроводжується гіперпродукцією ІgЕ, спостерігається у більшості пацієнтів з клінічним діагнозом АР і є основним імунологічним лабораторним критерієм цього захворювання. Однак клінічні прояви АР можуть спостерігатись у пацієнтів при відсутності цих виражених імунологічних змін показників. Частіше всього така ситуація зустрічається у хворих з ІgЕ-незалежною формою АР [18, 125].

Подальший пошук критеріїв, що дозволяє диференціювати різні форм АР нашою дослідників на відкриття нових патогенетичних механізмів формування захворювання. Одним із таких критеріїв може служити різний рівень цитокінів, який може знаходитись у різних рівнях у пацієнтів з ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формою АР. Як правило АР виникає в результаті ІgЕ-опосередкованої алергічної реакції, зв'язаної із запаленням слизової оболонки носа різної інтенсивності [18]. Клітини, медіатори запалення, цитокіни, хемокіни, нейропептиди, а також молекули адгезії взаємодіють у складних мережних взаємодіях, викликаючи специфічні симптоми і неспецифічну назальну гіперреактивність. Розуміння механізмів виникнення захворювання забезпечує



основу для раціональної терапії цих розладів, що базується на розвитку складних запальних реакцій.

**IgE-залежні механізми.** Алергічну реакцію може викликати постійна продукція IgE, який синтезується у відповідь на різноманітні алергени, такі як інгаляційні, харчові та інші [100]. Порівняно із загальною кількістю імуноглобулінів рівень імуноглобуліну E становить найменшу частку (50-30 нг/мл IgE порівняно з 10 мг/мл IgG). Треба зазначити, що біологічна активність IgE значно зростає завдяки специфічним рецепторам на поверхні клітин, з якими він зв'язується. Ці рецептори можуть мати високу або низьку ступінь спорідненості з IgE [42].

IgE-залежний механізм розвитку алергії виникає внаслідок синтезу IgE та є результатом складних взаємодій між В-клітинами, Th1/Th2-лімфоцитами, які впливають на рівень IgE [18, 36, 42, 88].

Механізм розвитку алергічної реакції починається зі зв'язування алергенспецифічних IgE із FcεRI рецепторами на поверхні мастоцитів та базофілів. В подальшому при потраплянні специфічного алергену в організм, цей алерген зв'язується з уже утвореним комплексом IgE-рецептора, що призводить до синтезу медіаторів (гістаміну, лейкотрієнів та інших), які викликають алергічну відповідь [42]. Відповідь на алерген залежить від органу-мішені: зазвичай це свербіж, чхання, ринорея і закладеність носа, з бронхоспазмом. Наявність мастоцитів в слизовій оболонці дихальних шляхів є важливим патофізіологічним фактором при алергічному риніті і астмі, оскільки інгаляційні алергени впливають на поверхню слизової оболонки носа і/або легенів. В пізній фазі алергічних реакцій при хронічних запальних процесах в легенях, такі як Т-лімфоцити, мастоцити і еозинофіли [131].

**IgE-незалежні механізми.** На сьогодні встановлено, що алергени, завдяки своїй ферментативній протеолітичній активності, мають здатність безпосередньо активувати епітеліальні клітини. Це в результаті може викликати імунну відповідь за участю Th2 лімфоцитів, що супроводжується вивільненням цитокінів і

хемокінів [97]. Таким чином, алергени мають потенціал спричинити запалення дихальних шляхів незалежно від наявності IgE. Крім того, алерген Der p 1 виявляє здатність впливати на щільність контактів між епітеліальними клітинами, збільшуючи проникність епітелію [97].

### **Діагностика алергічного риніту**

Діагностика АР базується на узгодженні типових алергічних симптомів в анамнезі та діагностичних тестів. Типові симптоми алергічного риніту включають ринорею, чхання, закладеність носа і свербіж. Часто спостерігаються очні симптоми, особливо в пацієнтів з алергією на зовнішні алергени. Діагностичні тести базуються на виявленні алергенспецифічних IgE - шкірні проби або специфічні IgE в сироватці крові. Визначення загального типу IgE при діагностиці АР має погану прогностичну цінність. І навпаки визначення специфічних IgE в сироватці має важливе діагностичне значення, аналогічне показникам шкірних тестів [18, 36, 55].

Шкірні проби широко використовуються для демонстрації IgE-опосередкованої алергічної реакції. Ці тести є основним діагностичним інструментом в області алергії. При правильному виконанні вони дають корисні підтверджуючі докази для діагностики конкретного виду алергії [16, 17].

### **Діагностика алергії до кліщів домашнього пилу**

Для діагностики сенсibiliзації до алергенів кліщів домашнього пилу широко використовуються методи *in vivo* і *in vitro*. Серед методів *in vivo* діагностики важливе місце займає метод шкірного тестування, який виявляє реакції негайного типу в разі IgE-залежних алергічних реакцій. У разі невідповідності результатів шкірного тестування і анамнезу, рекомендується використовувати провокаційні тести [16].

*In vitro* діагностика дослідження рівнів загального і специфічних IgE-антитіл в діагностиці алергічних захворювань використовується з 1967 р. Для визначення рівнів специфічних IgE-антитіл велике значення має якість використовуваних реагентів; по можливості необхідно використовувати

стандартизовані екстракти. Вимірювання рівнів специфічних IgE-антитіл не залежить від прийому медикаментів або наявності шкірних захворювань. При використанні стандартизованих алергенів результати, отримані при визначенні алерген-специфічних IgE-антитіл, тісно корелюють з даними шкірного тестування і провокаційних назальних тестів [36, 61].

### **Компонентна діагностика (Component resolved diagnostic, CRD, CR-діагностика).**

На сьогодні наявність антитіл класу IgE до алергенних молекул можна виявити за допомогою однокомпонентних або багатокомпонентних методів. Багатокомпонентний підхід дає змогу оцінити відповідь IgE на широкий спектр алергенів, які нанесені на чіпі, незалежно від клінічних проявів.

Відкриття імуноглобуліну IgE у кінці 1960-х років дало змогу використовувати його як специфічний біомаркер для ідентифікації АЗ, спричинених алергенами навколишнього середовища. У традиційних тестах для визначення IgE-антитіл, таких як шкірні прик-тести та в тестах для визначення специфічних IgE (sIgE) *in vitro*, використовують неочищені екстракти, отримані з джерела алергену, які містять алергенні та неалергенні молекули. Застосування ДНК-технологій у кінці 1980-х років дало можливість описувати та клонувати алергенні молекули АЗ. Останнє десятиліття відзначилось появою нової фази діагностики алергії [WAO - ARIA - GA<sup>2</sup>LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020], що називається точною молекулярною алергодіагностикою (PAMD@; precision allergy molecular diagnostic applications). Використання алергенних молекул відкрило нові можливості в лікуванні хворих на АЗ [36, 61, 79]. Діагностику на основі алергенних молекул називють компонентною алергодіагностикою (CRD; component-resolved diagnostics) або молекулярною алергодіагностикою (MAD; molecular allergy diagnostics). Багатокомпонентна алергодіагностика особливо підходить для пацієнтів зі складним профілем сенсibilізації або симптомів. Багатокомпонентна технологія –

це консолідований підхід PAMD@ для поліпшення діагностики, прогнозу та відбору пацієнтів для АСІТ [61].

Один із методів багатокомпонентної діагностики алергії був розроблений компанією MADx зі штаб-квартирою у Відні (Австрія). Тест отримав назву ALEX (Allergen Explorer). ALEX представляє собою набір алергенів, які нанесені на тверду фазу за допомогою наночастинок. У складі тесту ALEX містить 292 алергени – з яких 117 екстрактів алергенів і 178 рекомбінантних або високоочищених молекул. За допомогою цього мікрочіпу можна визначати профіль IgE як до екстрактів алергенів, так і до рекомбінантних або очищених алергенних білків. Цей аналіз має дві особливості: може використовуватися за стратегією діагностики алергії «знизу-вгору», коли спочатку проводять дослідження з окремими молекулами алергенів перед дослідженнями з екстрактами алергенів [79]; може використовуватися для діагностики розширеного профілю IgE, що відповідає принципам персоналізованої медицини [112]. Для використання цього підходу необхідне максимально точне визначення фенотипу пацієнта для встановлення його ендотипу [23], що забезпечує формулювання точного діагнозу та призначення відповідного лікування. Крім того, однією з переваг тесту ALEX є наявність інгібітора карбогідратних детермінант (CCD), який пригнічує клінічно незначущу перехресну сенсibilізацію та безпосередньо впливає на первинну інформацію про сенсibilізацію [57].

Застосування багатокомпонентної діагностики з використанням мікрочіпів надає можливість проводити оцінку до більш ніж 100 різних компонентів, які належать до різних джерел інгаляційних та харчових алергенів, алергенів латексу та алергенів отрути комах *Hymenoptera*. Використання інструментів штучного інтелекту дало нові можливості для інтерпретації результатів і запровадило нові концепції діагностичного підходу.

Поява нових технологій дала можливість діагностувати не тільки конкретний антигенний білок, але і аналізувати різні епітопи. З введенням в

практику молекулярних біотехнологій стала можлива молекулярна ідентифікація багатьох важливих алергенів, що беруть участь в розвитку захворювання. Для більшості алергенів (таких як пилок дерев, злаків, кліщів, лупа тварин, цвілі та ін.) стала можливою розробка рекомбінатних алергенів. Також було встановлено, що використання рекомбінантних алергенів разом з екстрактами алергенів, значно підвищує чутливість діагностичних методів, оскільки рекомбінатні алергени містять велику кількість епітопів натуральних алергенів.

При компонентній діагностиці алергії до КДП визначають специфічні IgE-антитіли до рекомбінантних і очищених молекул алергенів (nDer p 1, nDer f 1, nDer p 2, rDer f 2, rDer p4, rDer p5, rDer p 7, rDer p11, rDer p20, rDer p21, rDer p23, rDer p 10, rEur m 2 та інші). Це допомагає в ідентифікації головних алергенів і в виключенні перехресної реактивності з такими алергенами, як, наприклад, тропомиозин кліщів. Також компонентна діагностика допомагає виділити групи пацієнтів, які мають нетипові профілі сенсibilізації та мають полівалентну сенсibilізацію [6, 80].

На сьогодні встановлено, що КДП, такі як *Dermatophagoides pteronyssinus* (*D. pteronyssinus*) або *Dermatophagoides farinae* (*D. farinae*) є джерелом важливих алергенів в усьому світі. Доведено, що алергія до КДП супроводжується утворенням алергенспецифічних IgE у високих титрах та є причиною виникнення бронхіальної астми. Існують переконливі докази асоціації алергічних станів, таких як БА, АР, атопічний дерматит (АД), з впливом КДП [80]. Дані деяких досліджень показують, що розвиток сенсibilізації до КДП в подальшому може призвести і до полісенсibilізації [102].

## **1.2. Характеристика алергенів кліщів домашнього пилу**

КДП становлять значну частину алергенів, які містяться в домашньому пилу. Вони належать до сімейства *Pyroglyphidae*, підкласу *Acari*, класу *Arachid*, роду *Anthropods*. У розвитку сенсibilізації найбільшу роль відіграють кліщі *Dermatophagoides pteronyssinus* (*Der p*), *Dermatophagoides farinae* (*Der f*), *Euroglyphus maynei* (*Eur m*) [144]. КДП живляться людським епітелієм, який у

великих кількостях накопичується в ліжках, килимах, м'яких меблях. Саме тут створюються оптимальні умови для росту і розмноження кліщів: температура навколишнього повітря до 25 ° С і вологість до 60-75% [8]. Алергічна реакція на КДП характеризується симптомами, які частіше виявляються ввечері або вночі після контакту з постільними принадлежностями. Захворювання може загостритися під час перебування в поїздах, театрах і кінотеатрах, в місцях де збирається велика кількість людей. Симптоматика в основному включає риніт, atopічний дерматит та бронхіальну астму. Незважаючи на те, що КДП присутні в домашньому пилу протягом усього року, спостерігаються сезонні коливання їх чисельності, збільшуючись у вологі періоди. Ці особливості слід враховувати при зборі анамнезу [8].

Поширеність сенсibilізації до КДП та їх вплив на людину залежить від низки екологічних факторів, а саме клімату і мікроклімату, мікроареалів кліщів у домашньому середовищі тощо. Наразі, у світі відомі декілька видів КДП, які можуть викликати алергічну сенсibilізацію.

За даними <http://allergen.org/>, офіційного сайту систематичної номенклатури алергенів, який схвалений Всесвітньою організацією охорони здоров'я та Підкомітетом з номенклатури алергенів Міжнародної спілки імунологічних товариств (ВООЗ/ІUIS), найбільшу кількість алергенних білків, 31 та 36 відповідно, мають кліщі *D. pteronyssinus* або європейський кліщ домашнього пилу та *D. farinae* – американський пиловий кліщ [6]. Обидва містять основні алергени – білки групи 1 і 2. Висока гомологія між цими видами кліщів призводить до поширених перехресних реакцій.

Описані й алергени двох інших видів пилових кліщів. Це *Dermatophagoides microceras* (1 алергний білок Der m 1) та *Euroglyphus maynei*. Він має 5 алергенів, від Eur m 1 до Eur m 4 та Eur m 14 [6].

Основні з алергенних білків КДП входять до декількох класів: цистеїнові протеази (Der f 1, Der p 1, Der m 1, Eur m 1) – група 1, NPC2 family (Der f 2, Der p 2, Der m 2, Eur m 1) – група 2. Der p 10 та Der f 10 відносяться до тропоміозинів,

Der p 15 та Der f 15 – до хітиназоподібних білків та хітиназ відповідно, а Der p 20 та Der f 20 складають групу аргинін-кіназ [129, 130].

Алергени кліщів поділяються на різні групи, такі як 1-14, 23, залежно від їх біохімічного складу, молекулярної маси і гомологічних послідовностей [119, 130].

Алергени 1 групи є глікопротеїнами з властивостями цистеїнпротеази, з молекулярною масою 25 кДа. Вони походять з клітин, які покривають кишковий тракт кліщів. До цієї групи належать Der f 1, Der p 1, Eur m 1 [130]. Алергени Der p 1 і Der f 1 володіють високим ступенем гомології, що становить майже 80% з подібностей за рахунок наявності перехреснореактивних епітопів, але також мають і видоспецифічні епітопи. Незважаючи на те, що гени Der p 1, 2 і 3 розташовані поруч в геномі кліщів, вони демонструють високий ступінь поліморфізму [130].

Алергени 2 групи є білками з молекулярною масою 15 кДа, відносяться до сімейства NPC2 (Niemann-Pick type C 2 proteins). Білки даної групи мають різний ступінь гомології. Утворення алергенів 2 групи пов'язано з секрецією репродуктивного тракту кліщів. Ступінь гомології Der p 2 і Der f 2 становить 88%. Для алергенів даної групи характерна спорідненість між алергенами КДП і алергенами амбарних кліщів - Der p 2 і Lep d 2 -37%, Der p 2 і Tug p 2 - до 40% [43]. Der p 1 і Der p 2 володіють ферментативною активністю і мають здатність вивільняти нітрит азоту з альвеолярних макрофагів [96]. Ферментативна активність Der p 1 сприяє підвищенню проникливості епітеліальних клітин, стимулює вивільнення IL-6, IL-8 і GM-CSF з епітеліальних клітин дихальних шляхів [68].

У загальній популяції спостерігається визначається специфічних IgE-антитіл до Der p 1 і Der p 2 до 80% осіб. Близько 20% пацієнтів, які сенсibilізовані до КДП, не мають специфічних IgE-антитіл до алергенів 1 і 2 груп. Це пояснюється тим, що існує значна кількість інших груп алергенів КДП, які демонструють високу здатність виробляти специфічні IgE-антитіла, однак їх концентрація в екстрактах домашнього пилу залишається невеликою [130].

Наприклад, Der p 3 може розглядатися як головний алерген КДП, сенсibilізація до якого виявляється в 50% випадків. Проте, специфічні IgE до Der p 3 присутні в крові в низьких титрах через низьку частоту виявлення самого алергену. Утворення специфічних IgE-антитіл до алергенів Der p 4, 5, 6 і 9 зспостерігається в 37-50% випадків. Проте вони виявляються в крові в низьких концентраціях за тієї ж самою причиною [130].

Алергени Der p 3, 6 і 9 представляють собою трипсин- та хемотрипсинподібні колагенолітичні серинові протеази відповідно. Ці протеази, ймовірно, беруть участь в процесах травлення кліща, оскільки їх виявлено в клітинах, що розташовані окремо від стінки кишечника, а також фекаліях [8]. На відміну від білків першої групи вони не відіграють вагомій ролі в зв'язуванні з IgE. Протеази *D. pteronissinus* активують еозинофіли і бронхіальні епітеліальні клітини, сприяють виділенню запальних медіаторів мастоцитів [11].

Der p 7 відноситься до головних алергенів КДП поруч з Der p 1 і Der p 2. Понад 50% осіб, з алергією до КДП, мають специфічні IgE-антитіла до Der p 7. Цей алерген здатний стимулювати синтез специфічних IgE-антитіл в тому ж обсязі, що і Der p 2 [85]. Крім того, існує перехресна реактивність Т-клітин на алергени 1 і 7 групи, що підтверджується продукцією цитокінів, які стимулюють проліферацію клітин та розвитку запалення [54].

Алергени КДП групи 5, 7 і 21 можуть зв'язуватись з ліпідами, глікопротеїнами і гліколіпідами, і таким чином взаємодіють з вродженою імунною системою і впливають на презентацію антигену [130]. Алергени цих груп виявляються приблизно у 30% пацієнтів з алергією на КДП та початковою стадією алергічної астми. Дослідження структури димеризованного Der p 5 підтверджує наявність великої гідрофобної кишені, яка може бути місцем взаємодії з гідрофобними лігандами. Таким чином, подібно як алергени 2 групи КДП, можуть транспортувати патоген-асоційовані молекулярні патерни (PAMPs) ліпідної природи [87]. Крім того, Der p 5 сприяє синтезу IL-6 і IL-8 в епітеліальних клітинах дихальних шляхів людини [67]. Алергени групи 7 мають



подібну структуру з ліпопротеїд-зв'язуючим білком. Вони відрізняються від білків групи 2 тим, що вони не зв'язуються з ліпополісахаридами, але можуть взаємодіяти з іншими лігандами, активуючи при цьому TLR 2-4 [130].

За структурними гомологіями послідовностей алергени груп 2, 13 і 14 можуть бути віднесені до білків, що взаємодіють з жирними кислотами і ліпідами. Der p 2 має структурну схожість з корцептором TLR4 MD-2 (11% ідентичності, 29% подібності), також відомим як лімфоцитарний антиген 96 (LY96) [130]. Але найбільшу подібність послідовностей та тривимірної структури Der p 2 має з NPC2 (Niemann-Picktype C2 proteins) - 23,5% ідентичності, 44% подібності. Аналіз взаємодії з ліпідами та мас-спектрометрія підтвердили, що Der p 2, а також його гомолог Der f 2, подібно як і NPC2 зв'язують холестерин. Алергени групи 13 також здатні взаємодіяти з жирними кислотами та іншими ліпідами, такими як ейкозаноїди і ретиноїди.

Алергени КДП 14 групи мають структурні аналогії з білками переносниками ліпідів LLTP (large lipid transfer protein) та включають аполіпофорні або вітелінгенінподібні білки, які здійснюють накопичення і транспорт енергії [43].

Інші алергени КДП мають ферментативну активність: групи 4, 8 і 20 – представлені амілазами, глутатіон-S-трансферазами і аргінін-кіназами відповідно. У свою чергу, групи 12, 15 і 18 демонструють структурну подібність з хітиназами [63].

Білки тропоміозину і параміозину належать до груп 10 і 11 відповідно. Тропоміозин Der p 10 хоча є мінорним алергеном, відзначається високою гомологічною послідовністю з іншими тропоміозинами. Ця гомологія призводить до значущої перехресної взаємодії з продуктами тваринного походження, що може призвести до важких алергічних реакцій [107, 110]. Der p 11, або параміозин кліща, має вторинну роль у пацієнтів з респіраторною формою алергії на КДП, але водночас він є основним алергеном у пацієнтів з atopічним дерматитом. Подібно до алергенів Der p 14 і Der p 18, тропоміозин і параміозин кліща не

зустрічаються в фекаліях Це вказує на те, що сенсibilізація до цих алергенів відбувається при контакті кліща зі шкірою. Дослідження показали, що такий контакт зі шкірою може викликати алергічну сенсibilізацію та навіть підсилювати подальші респіраторні алергічні реакції на цей же антиген [44]. Алергени групи 16 та 17 ідентифіковані як EF-Ca<sup>2+</sup> зв'язуючі білки [63].

Важливим аспектом є визначення рівня білків Der p 10/Der f 10, відомих як тропоміозин КДП. Тропоміозин є білком з молекулярною масою 35-37 кДа, який присутній в клітинах усіх представників тваринного світу [11, 110]. Приблизно 10% пацієнтів з сенсibilізацією до КДП мають специфічні IgE-антитіла до тропоміозину. Частота сенсibilізації до Der p 10 може значно варіювати від дуже високої (до 80% в Японії) до менш низької (до 10% в Європі). Der p 10 і Der f 10 демонструють високу ступінь гомології (98%) [84], що призводить до значущої перехресної реактивності. Дослідження показують формування перехресної реактивності між тропоміозином КДП та іншими джерелами алергенів від 75% до 80%. Наприклад, характерною особливістю сенсibilізації до морепродуктів (креветок) є одночасна сенсibilізація до тропоміозину кліщів. Пацієнти, у яких виявлено специфічні IgE-антитіла до Der p 10 мають більш високий ризик виникнення алергічних реакцій до морепродуктів, паразитів і комах [44, 75, 104]. Важливо також відзначити, що ступінь гомології тропоміозину КДП і людського тропоміозину може досягати 56% [36].

Ласкет А. запропонував переглянути класифікацію алергенів на підставі їх здатності стимулювати вроджені імунні реакції. З цієї точки зору, дві основні групи алергенів відіграють важливу роль у природженому імунітеті: протеази (групи 1, 3, 6 і 9), які активують передачу сигналів через протеолітичні атаки та ліпідзв'язуючі білки (групи 2, 5, 7, 13, 14 і 21), що можуть транспортувати PAMPs на основі мікробних ліпідів. Однак, залишається невідомим, чи мають ліпідзв'язуючі білки власну алергенність, чи їх здатність активувати клітини зумовлена зв'язаними з ними ліпідами [63].

Таким чином, з врахуванням усіх відомостей - головними алергенами КДП є Der p 1 (цистеїнова протеаза) і Der p 2 (сімейство NPC2). Більш ніж у 80% пацієнтів, сенсibilізованих до КДП, в сироватці визначаються специфічні IgE-антитіла до одного або двох з цих компонентів [119]. Отже, Der p 1 і Der p 2 можуть бути маркерами специфічної сенсibilізації до КДП і надалі, при необхідності, основними діагностичними маркерами для проведення АСІТ [306 132].

Обґрунтуванням для АСІТ є модифікація основних механізмів алергічного захворювання, що викликає стійкий клінічний ефект, заснований на алергенспецифічній толерантності, пригніченні запалення і багатокomпонентному клінічному поліпшенні. На сьогодні АСІТ до КДП застосовується підшкірним (SCIT) або сублінгвальним (SLIT) шляхом, причому останній метод має дві альтернативи: краплі і таблетки. Подібні механізми індукції алерген-специфічного IgG4, індукції IgE-блокуючих антитіл IgG, толерантності Т-клітин і зниження відповіді Th2 описані як для SCIT, так і для SLIT.

### **1.3. Алергенспецифічна імунотерапія в лікуванні алергії на кліщів домашнього пилу.**

Наступним логічним кроком після отримання повної інформації про індивідуальний профіль сенсibilізації конкретного пацієнта є прогностична оцінка різних форм алергенспецифічної імунотерапії.

Оскільки лікувальні та діагностичні алергени робляться з натуральної сировини, слід пам'ятати, що варіабельність композиції і концентрації алергенів в різних послідовних серіях сировини прямо пов'язана з такою в лікувальних алергенних екстрактах, вироблених на основі цієї сировини. Отже, склад і концентрація алергенів можуть варіювати між серіями. Якість алергену сильно залежить від якості вихідної сировини, яка повинна відповідати високим стандартам, видобуватися і оброблятися відповідно до регуляторних вимог.

На сьогоднішній день прийнята наступна система стандартизації алерговакцин за змістом мажорних алергенів кліщів домашнього пилу: в 100 IR референт препарату міститься: Der p 1 = 25 µg / ml, Der f 1 = 16 µg / ml.

Результати численних клінічних випробувань свідчать про доказову ефективність алергенспецифічної імунотерапії [12, 24, 26]. Однак описані випадки як дуже високого і середнього терапевтичного ефекту, так і його відсутність. Досі не розроблені об'єктивні критерії, які дозволяють прогнозувати ефективність АСИТ. На сьогодні необхідним є впровадження об'єктивних лабораторних маркерів, що визначають доцільність проведення АСИТ у осі з алергією, що дозволить оцінювати динаміку в ході терапії. Проведення АСИТ з алергенами КДП показує зниження неспецифічної бронхіальної гіперреактивності. Також доведено, що проведення АСИТ в ранньому дитячому віці може попереджати розвиток сенсibilізації до інших груп алергенів. Виходячи з цих тверджень, підбір пацієнтів для проведення АСИТ не повинен базуватися тільки на визначенні сенсibilізації до Der p 1 і Der p 2. Діагностичні тести, які містять перехресно-реактивні алергени, в тому числі Der p 10, можуть бути використані для виявлення пацієнтів, в меншій ступені придатних для проведення АСИТ.

Сучасні уявлення про алергічні захворювання з позиції клінічної алергології повинні включати розуміння механізмів розвитку імунологічних порушень, що дозволить винайти й правильно підібрати методи і засоби їх лікування. З огляду на сучасні знання про розвиток алергії - алергічні захворювання є складними вродженими та адаптивними реакціями імунної системи на алергени, які оточують нас в навколишньому середовищі. Ці реакції призводять до запальних процесів, де переважають клітини Th2 та специфічні IgE [7].

Під час розвитку алергічних захворювань ефекторні клітини Th2 крім традиційних цитокінів Th2, таких як IL-4, IL-5, IL-9 і IL-13 [11, 12], продукують також нові цитокіни з прозапальними функціями, такі як IL - 25, IL-31 та IL-33 [105]. Важливу роль у цьому процесі відіграють і Treg- клітини. Встановлено, що

Treg-клітини, які синтезують IL-10, були знижені в крові у пацієнтів з АР, хоча кількість і функції CD4 + CD25 + Treg-клітин залишались нормальними [56].

Оскільки алергічні захворювання є результатом складних імунних порушень, АСІТ спрямована на стимуляцію толерантності периферичних Т-клітин, регулювання порогів активації опасистих клітин і базофілів, а також зниження вивільнення гістаміну, спричиненого дією IgE [7]. Індукція толерантності периферичних Т-лімфоцитів є ключовим кроком у лікуванні формуванням алергенспецифічних Treg-клітин, які мають здатність синтезувати протизапальні цитокіни, такі як IL-10 і TGF- $\beta$ . Treg-клітини не лише знижують імунну відповідь Th2, але також впливають на інші типи клітин: дендритні клітини, опасисті клітини, базофіли і еозинофіли. Крім того, Treg-клітини регулюють продукцію алергенспецифічних IgE і здатні індукувати продукцію IgG4 і IgA [84]. Особливість Treg-клітини полягає в їхній здатності пригнічувати дегрануляцію тучних клітин [52]. Існує два основних види Т-регуляторних клітин з різними фенотипами і механізмами дії. Один з них - це природні, відібрані в тимусі клітини FOXP3+CD4+CD25+Treg. Інший вид називається індукцибельні Treg-клітини, що генеруються на периферії в толерогенних умовах. Два види індукцибельних Т-регуляторних клітин, а саме FOXP3+ і IL-10-позитивні клітини Tr1, відіграють ключову роль в розвитку толерантності до алергену, які можуть активуватися під впливом АСІТ [89, 118].

Treg-клітини, які активуються під впливом TGF- $\beta$ , мають високий потенціал стійкості до алергенів. Цей цитокін не лише пригнічує проліферацію і диференціювання В-клітин, але також знижує синтез імуноглобулінів у слизових оболонках, за винятком IgA [21, 70, 77]. TGF- $\beta$  сприяє подальшому перетворенню CD4+CD25+Т-клітин із наївних CD4+CD25-Т-клітин [25, 70]. Окрім цих двох основних популяцій Treg-клітин, було виявлено кілька інших видів Т-клітин з регуляторною функцією. До таких клітин відносять CD8+CD28-Т-клітини, які продемонстрували супресорну здатність в умовах *in vitro*. Вони здатні запобігати

активації молекул В7, що індукується Т-хелперами на антигенпрезентуючих клітинах, і відігравати роль в підтриманні толерантності [143].

IgG4 – імуноглобуліни, які не викликають запалення і відіграють захисну роль у алергічних реакціях. Зазвичай вважається, що IgG4 тим самим запобігає активації опасистих клітин і базофілів [7]. IgG4 не здатний ефективно активувати комплемент і містить два різних антигензв'язуючих сайти на одній молекулі. Біоспецифічність перетворює антитіло в функціональне моновалентне антитіло, що перешкоджає утворенню комплексів [117].

Успішна АСІТ пов'язана з підвищенням активності блокуючих IgG, яка залежить не лише від кількості антитіл IgG [134]. Важливим є оцінка блокуючої активності і спорідненості специфічного IgG, зокрема IgG4, IgG1, а не їх рівнів в сироватці. Індукція IgG також впливає на пригнічення антиген-презентуючими клітинами IgE, а також на зменшення вивільнення медіаторів від опасистих клітин і базофілів [134]. Під час АСІТ спостерігається тимчасове підвищення рівня специфічних IgE в сироватці з подальшим поступовим зниженням протягом місяців або років лікування [39].

Рівні IgE в сироватці не можуть повністю пояснити зниження чутливості до конкретного алергену, оскільки зниження рівнів IgE в сироватці відбувається відносно пізно і не корелює з клінічним поліпшенням після АСІТ. Зниження співвідношення IgE/IgG4 під час АСІТ, імовірно, вказує на зміни у алергенспецифічних Th2-клітин над Treg-клітинам. Оскільки переключення класу на IgG4 викликається костимуляцією IL-4 і IL-10, IL-10 знижує індуковану IL-4 продукцію Ig та посилює продукцію IgG4. Таким чином, IL-10 не тільки генерує толерантність в Т-клітинах, але також регулює формування ізо типу алергенспецифічних антитіл в незапальному напрямку [39].

В-клітини представляють єдиний тип клітин, який має здатність виробляти антитіла і, таким чином, вони є головним компонентом гуморальних імунних реакцій. Регуляторні В (Breg) клітин секретують IL-10 та відіграють ключову роль у регулюванні проліферації Т-лімфоцитів хелперів і Т-лімфоцитів пам'яті та

Т-регуляторних клітин [40]. Недавні дослідження вказують на існування кількох фенотипово різних популяцій Vreg-клітин, які продукують IL-10 [39, 40, 73]. Одним із добре вивчених підкласів є CD1dhiCD5+CD19hi Vreg клітини [40]. Таким чином, ці антигенспецифічні V reg-клітини можуть потенційно використовуватися для розробки нових методів АСІТ.

Останні досягнення в розумінні молекулярних механізмів імунної регуляції в галузі алергології надали важливі знання про толерантність до алергенів. Важливим аспектом є індукція толерантності периферичних Т-клітин за участю Treg-клітин, яка є ключовим етапом в пригніченні алергічного запалення. Treg клітини виділяють супресивні цитокіни, такі як IL-10 і TGF- $\beta$ , і сприяють утворенню підтипів незапальних антитіл, таких як IgG4 і IgA. Розробка та впровадження нових вакцин дозволить скоротити тривалість проведення АСІТ, зменшити тривалість застосування та підвищити її ефективність.

## РОЗДІЛ II

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

#### 2.1. Загальна характеристика клінічних спостережень

Для відбору групи пацієнтів на АР із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу у рандомізований спосіб обстежено 858 хворих, які звернулись на консультативний прийом на кафедру клінічної імунології та алергології з курсом медичної генетики ім. О.О. Богомольця та Клініку сімейної та функціональної медицини FxMed впродовж 2016-2017 років із попередньою стратифікацією за наявністю алергічної симптоматики. Всім пацієнтам проводили комплексне клініко-лабораторне обстеження, інструментальні, цитологічні та специфічні алергологічні дослідження. Дослідження проводилось відповідно до 7-го перегляду принципів Гельсінкської декларації прав людини (2013), Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину та відповідних законів України.

Вік обстежених складав  $28,6 \pm 2,4$  років, серед яких було 49 (43,7%) жінок і 63 (56,3%) чоловіків. Всім пацієнтам виконані клінічні, загальні лабораторні, інструментальні, цитологічні та специфічні алергологічні дослідження. Клінічний діагноз АР без або у поєднанні із БА визначений за критеріями ARIA (2016), GINA (2016-2017) [18, 47].

У групу для подальшого дослідження увійшло 60 осіб, Групу порівняння склали 42 пацієнтів з АХ відповідного віку і статі, які з різних причин відмовились від АІТ і приймали відповідну симптоматичну терапію.

У групу для подальшого дослідження ввійшли 60 осіб, з них 73 (44,2%) жінок і 92 (55,8%) чоловіків, вік яких складав  $32,6 \pm 2,4$  років (від 18 до 52 років), які дали інформовану згоду на проведення АСІТ. Пацієнти знаходились на лікуванні у клініці сімейної та функціональної медицини FxMed, яка являється базою кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця. Діагноз алергічний



риніт був встановлений на основі клінічних критеріїв і рекомендацій ARIA [ 17, 18].

Критеріями включення були:

- наявність симптомів специфічних для АР
- наявність сенсibiliзації до кліщів домашнього пилю *D.pteronysinus* та *D. farinae* за результатами шкірних тестів та результатами специфічних IgE в сироватці крові до екстрактів кліщів домашнього пилю та їх компонентів (*Der p 1, 2*) і (*Der f 1, 2*) відповідно;
- відсутність інших алергічних патологій та анатомічних порушень носоглотки;
- вік пацієнтів 20-60 років.
- добровільна згода пацієнта на участь в дослідженні

Критеріями виключення були:

- хронічний риносинусит,
- наявність поліпів носа,
- неалергічний (інфекційний) риніт,
- вік молодше 20 років і старше 60 років.
- вагітність.

Важкість клініки АР оцінювали за допомогою шкали назальних симптомів: чхання, закладеність носа, ринорея, зуд; оцінка 0 – відсутні, 1 –легкі, 2-помірні, 3 –важкі, максимум до 12 балів.

Оцінку функції зовнішнього дихання виконували на підставі результатів спірометрії (BTL-08 Spiro Pro, виробник BTL (Чехія).

Для дослідження хворі були розподілені на дві групи за рівнем загального IgE.

I група – особи з АР, рівень загального IgE в сироватці крові яких становив >100 kU/L; (n=30)

II група - особи з АР, рівень загального IgE в сироватці крові яких становив <100 kU/L. (n=30)

Контрольну групи склали 20 здорових осіб віком 20-60 років без ознак будь-яких алергічних захворювань та відсутньою патологією носоглотки.

Наявність сенсibilізації до кліщів домашнього пилу визначали за допомогою шкірних прик-тестів. Шкірні прик-тести виконували екстрактами алергенів (Immunotek, Іспанія), постановка і оцінка результатів проводилась відповідно до європейських вимог [16].

Рівень загального сироваткового IgE та рівень специфічних IgE до компонентів алергенів (sIgE) визначали за допомогою колориметричного ферментного аналізу (Macro Array Diagnostic, ALEX, Австрія).

Оцінку ефективності проводили за візуальною аналоговою шкалою (ВАШ) [72]. За допомогою лінійки оцінювання вимірювали відстані (мм) на 10-сантиметровій лінії між кінцем «відсутність ознак симптому» та міткою пацієнта, забезпечуючи діапазон оцінок від 0–100, зокрема: відсутність симптому (або ознак) (0–4 мм), легкі ознаки (ознака / симптом чітко присутні, але з мінімальною вираженістю; легко переноситься) (5–44 мм), помірні ознаки (певне відчуття ознаки / симптому, що турбує, але переноситься легко) (45–74 мм) та тяжкі ознаки (ознака/симптом, який важко переносити; порушує щоденну працездатність і життя і/або сон (75–100 мм). Розподіл симптомів наступний: верхні симптоми (четверо носових і троє неносових (очних) симптомів), двоє нижніх симптомів. Порівнювали симптоми до лікування і після 6, 12, 24, 36 місяців АСІТ.

Для визначення профілю сенсibilізації до кліщів домашнього пилу були отримані дані 16309 жителів 16 регіонів України, що, пройшли діагностику алергії за допомогою молекулярного тесту ALEX2. Пацієнти проживали в усіх географічних регіонах України – Лісовій, Лісостеповій та Степовій зонах. Найбільше протестованих пацієнтів, 19,62 %, проживали у столиці України м. Києві (Лісова зона), 14,48 % – у м. Одесі, 7,7 % – у м. Харкові (Степова зона), 7,55 % – у Дніпрі (Лісостеп).

Після первинної оцінки отриманої бази даних за географічною приналежністю та віком пацієнтів, до подальшого аналізу були включені дані

10651 осіб, регіон проживання та вік яких можна було встановити достеменно. Серед них було 6163 (57,86 %) дітей віком до 18 років та 4488 дорослих (42, 14 %).

Для автоматизації оброблення даних було розроблено комплекс програм на мові програмування Python. Усі пацієнти були згруповані по областях, щоб полегшити виділення просторових закономірностей.

Для виявлення закономірностей сенсibilізації була здійснена бінаризація даних. Пороговим значенням сенсibilізації до алергенів кліщів було визначене число 0,35 kU/L. Рівень сенсibilізації 0.35 і вище замінено на 1, менші значення – на 0.

Дослідження сенсibilізації населення України до різних молекул Der p та Der f (за кожним окремо та двома одночасно) було здійснено за трьома критеріями:  $J_1 = \text{«Вік»}$ ,  $J_2 = \text{«Географічна прив'язка»}$  та в комплексі –  $J_{12} = \text{«Географічна прив'язка різних вікових категорій»}$ .

Для дослідження за критерієм  $J_1 = \text{«Вік»}$  проаналізовано дані усіх пацієнтів, що мали сенсibilізацію до однієї або одночасно декількох молекул Der p та Der f: “Der f 1 - Der f 2 - Der p 1- Der p 2 - Der p 5 - Der p 7 - Der p 10 - Der p 11 - Der p 20 - Der p 21 - Der p 23”. Підрахована статистика щодо пріоритетних варіантів комплексів таких молекул залежно від віку – для дорослих та дітей.

Для дослідження за критерієм  $J_2 = \text{«Географічна прив'язка»}$  по кожній області підрахована кількість пацієнтів, в яких спостерігалась чутливість до кожної із молекул груп Der p та Der f. Тобто, до Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 11, Der p 20, Der p 21, Der p 23 окремо. А потім визначено пріоритетні молекули для регіону щодо кількості пацієнтів, сенсibilізованих до них, за таким алгоритмом: визначались перший і наступний за ним максимуми, тобто молекули, до яких пацієнти цього регіону були сенсibilізованими найчастіше. Якщо частота поширеності першого (абсолютного) максимум перевищувала частоту наступного за ним більше, ніж на 5%, тоді основною молекулою-сенсibilізатором у регіоні визначалася лише та

молекула, чутливість до якої зустрічалася найчастіше. А якщо частота поширеності сенсibilізації до першого максимуму дорівнювала частоті поширеності до другого або відрізнялася від нього менше, ніж на 5%, тоді робився висновок про те, що жителі регіону сенсibilізовані до двох молекул одночасно.

Для дослідження за критерієм  $J_{12}$  = «Географічна прив'язка різних вікових категорій» було застосовано алгоритм визначення критерію  $J_2$  = «Географічна прив'язка», але не до усіх даних, а окремо до дітей, а потім – окремо до дорослих. Аналіз проводився для двох видів молекул Der p та Der f одночасно.

### **2.1.1. Методика проведення шкірних-прик тестів**

Алергологічне обстеження методом шкірних проб для виявлення сенсibilізації до алергенів проводилося в умовах клінічних баз кафедри клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики з дотриманням умов передбачених протоколами чинного законодавства. Тестування проводили стандартизованими екстрактами алергенів виробництва Immunotek, Іспанія. Шкірні тести виконували виключно у період ремісії клінічних проявів, при відсутності інших протипоказань до тестування *in vivo*. Обов'язковою була відміна антигістамінних препаратів за 10 діб перед тестуванням. Постановка та оцінка результатів шкірних проб здійснювалася згідно з вимогами Наказу МОЗ України та АМН України за № 127/18 від 02.04.02. Шкірне алерготестування проводили методом прик-тестів. Оцінка проводилась через 20 хвилин після постановки алергенів на шкіру. Перед проведенням прик-тестів з алергенами для правильної оцінки результатів проводилися дві контрольні проби: Негативний контроль – фізіологічний розчин, який дозволяв оцінити реактивність шкіри та дермографізм та позитивний контроль - з 0,01 % розчином гістаміну, для прогностичної оцінки можливої реакції на алерген. Алергологічне тестування розпочинали лише у випадку позитивної реакції на гістамін та негативної - на фізіологічний розчин. Позитивною вважається проба більше 3 мм, негативною до 1 мм, сумнівною від 1 до 3 мм. Для постановки проби, шкіра тильної поверхні

передпліччя оброблялася 70 % етиловим спиртом, на неї на відстані 2,0-2,5 см наносили краплі алергенів. Далі проводився прокол попередньо натягнутої шкіри за допомогою зірчастого ланцету до опору обмежувача. При появі виражених реакцій на шкірі в перші 10 хвилин, ватними тампонами промокали надлишок алергену в місці проколу (тампон був окремим для кожної рідини). Алергічна реакція оцінювалась в міліметрах через 15-20 хвилин та вважалась позитивною при розмірі папули 3 мм та більше у порівнянні з контролями.

### 2.1.2. Методика проведення алергенспецифічної імунотерапії

Для лікування пацієнтів із АР викликаним сенсibiliзацією до алергенів кліщів домашнього пилу використовувались алергенні екстракти Alxoid, модифіковані глютаральдегідом (полімеризованим), адсорбовані на гелі з гідроксидом алюмінію для специфічної імунотерапії, що мають назву алергоїдів. Особливість алергоїдів – це висока імуногенність та безпека. Виробництво препаратів виконується компанією Immunotek, Іспанія. Immunotek стандартизує алергенні екстракти в біологічних одиницях (BU) відповідно до норм країн Європейського союзу. Біологічна концентрація екстрактів, які використовуються в Alxoid, вказана в терапевтичних одиницях (TU)/мл. 10000 TU/мл по білку еквівалентні 10000 BU/мл того ж немодифікованого екстракту. Ініціальна фаза лікування займала 4 тижні, далі пацієнт отримує підтримуючу дозу протягом мінімального рекомендованого терміну – 3 роки, та більше за необхідності. Схема застосування АСІТ представлена в таблиці 2.1.1. Проведення АСІТ виконувалось з дотримання сучасних європейських протоколів та протоколу МОЗ України «Про організаційні заходи по впровадженню сучасних технологій діагностики та лікування алергічних захворювань» N 127/18 від 02.04.2002. *Таблиця 2.1.1.*

#### Схема початкового лікування

Флакони	Об'єм однієї ін'єкції	Інтервал	Дата	Примітка
А 2000 ТО/мл	0,2 мл	7 діб	0 день	
	0,5 мл	7 діб	7 день	
В 10 000 ТО/мл				
	0,2 мл	7 діб	14 день	

	0,5 мл	30 діб	21 день	
	0,5 мл	30 діб	Кожні 30 днів	
	0,5 мл			Підтримуюча терапія протягом 3-5 років

Порядок, який застосовувався для роботи з алергенами:

- забезпечувався високий рівень асептики при роботі з флаконами;
- для маніпуляцій використовувати шприци на 1 мл (для інсуліну) з голками 5/10 або 6/10, довжиною 1 см;
- перед ін'єкцією повільно струшувався флакон, щоб лікарський засіб набув гомогенного стану;
- дезінфікувався гумовий ковпачок флакона спиртом після чого вставлялась голка, та набиралась необхідна доза препарату;
- перед введенням препарату дезінфікувалось спиртом місце ін'єкції – дельтоподібна ділянка зовнішньої поверхні руки, захищуючи шкіру, повільно проводився прокол шкіри для досягнення підшкірного простору, проводилась перевірка, щоб голка не потрапила в судину, а кров не потрапила до шприца;
- шлях введення препарату – підшкірна ін'єкція
- після введення препарату, ділянку шкіри, куди зроблено ін'єкцію, не протирали, за потреби заклеювали стерильним гіпоалергенним пластиром.

Пацієнт залишався у медичному закладі щонайменше на 30 хвилин після ін'єкції, щоб у разі виникнення небажаних побічних реакцій могла відразу надаватись необхідна медична допомога згідно уніфікованого клінічного протоколу екстреної, первинної, вторинної (спеціалізованої) та третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги «Медикаментозна алергія, включаючи анафілаксію» згідно до протоколу МОЗ України № 916 від 30.12.2015 р. Лікування проводилось на базі спеціалізованих клінічних баз кафедри клінічної

імунології та алергології з секцією медичної генетики з дотриманням умов передбачених протоколами чинного законодавства

### **2.1.3. Оцінка клінічної ефективності лікування.**

Оцінку ефективності проводили за візуальною аналоговою шкалою (ВАШ) [76, 93. За допомогою лінійки оцінювання вимірювали відстані (мм) на 10-сантиметровій лінії між кінцем «відсутність ознак симптому» та міткою пацієнта, забезпечуючи діапазон оцінок від 0–100, зокрема: відсутність симптому (або ознак) (0–4 мм), легкі ознаки (ознака / симптом чітко присутні, але з мінімальною вираженістю; легко переноситься) (5–44 мм), помірні ознаки (певне відчуття ознаки / симптому, що турбує, але переноситься легко) (45–74 мм) та тяжкі ознаки (ознака / симптом, який важко переносити; порушує щоденну працездатність і життя і / або сон). (75–100 мм). Розподіл симптомів наступний: верхні симптоми (четверо носових і троє неносових (очних) симптомів), двоє нижніх симптомів. Порівнювали симптоми до лікування і після 6, 12, 24, 36 місяців АІТ.

## **2.2. Лабораторні методи дослідження**

### **2.2.1. Визначення рівня загального IgE та рівня специфічних IgE до компонентів алергенів (sIgE)**

Рівень загального сироваткового IgE та рівень специфічних IgE до компонентів алергенів (sIgE) визначали за допомогою колориметричного ферментного аналізу (ALEX, Австрія).

Система ALEX є твердофазним імунологічним аналізом. Екстракти алергенів або молекулярні алергени, зв'язані з наночастинками, осаджені на твердій фазі та утворюють макроскопічну матрицю. Спочатку алергени, зв'язані із зазначеними частинками, реагують зі специфічним IgE, який знаходиться у зразку пацієнта. Після закінчення періоду інкубації неспецифічний IgE відмивається. Потім додають мічене ферментом детекторне антитіло до IgE людини, яке утворює комплекс зі специфічним IgE, зв'язане із твердою фазою. Після другої стадії промивки додають субстрат, який перетворюється на нерозчинний забарвлений осад за допомогою зв'язаного з антитілами ферменту. Реакцію

фермент-субстрат зупиняють шляхом додавання блокуючого реагенту. Кількість осаду пропорційна концентрації специфічного IgE у зразку пацієнта. Після завершення тесту зображення матриці аналізували за допомогою приладу Image Explorer аналізу (Австрія). Результати тесту аналізували за допомогою програмного забезпечення MADx Raptor в одиницях вимірювання IgE - kU/L.

Вміст алергенспецифічних IgE до компонентів алергенів оцінювали наступним чином: алерген не визначається або від'ємний (<0,3 kU/L, клас 0); рівень IgE низький (0,3-1 kU/L, клас 1), середній рівень IgE (1-5 kU/L, клас 2), високий рівень IgE (5-15 kU/L, клас 3), дуже високий рівень IgE (>15 kU/L, клас 4).

### **2.2.2. Визначення концентрації цитокінів в сироватці крові IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$**

Для дослідження Macro Array Diagnostic використовували сироватку хворих. Сироватку крові отримували шляхом центрифугуванням крові 10 хв при 3000 об/хв. Кров для дослідження забирали натще, шляхом венепункції. До проведення дослідження зразки зберігали у замороженому стані при -20<sup>0</sup>C.

Визначення ІЛ в сироватці крові проводили за допомогою методу імуноферментного аналізу згідно методичних рекомендацій, що додаються до стандартних наборів реактивів „IBL International, Німеччина”.

Принцип роботи набору. У наборі використано "сендвіч" -варіант твердофазного імуноферментного аналізу. Для реалізації цього варіанту використані два моноклональних антитіла з різною епітопною специфічністю до інтерлейкінів. Одне з них іммобілізоване на твердій фазі (внутрішня поверхня лунок), друге кон'юговане з лігандом. На першій стадії аналізу інтерлейкін, що міститься в калібрувальних та досліджуваних пробах, зв'язується з антитілами, іммобілізованими на внутрішній поверхні лунок. На другому етапі аналізу іммобілізований інтерлейкін взаємодіє з кон'югованим другим антитілом. Кількість зв'язаного кон'югату прямопропорційна кількості інтерлейкіну в досліджуваному зразку. На останній стадії аналізу в лунки вносять субстрат. Під



час інкубації з субстратною сумішшю відбувається забарвлення розчину в лунках. Ступінь забарвлення прямо пропорційна кількості зв'язаних мічених антитіл.

Після вимірювання оптичної щільності розчину в лунках на підставі калібрувальної кривої розраховується концентрація інтерлейкіну в досліджуваних зразках.

**2.2.3.** Визначення спонтанної та індукованої продукції цитокінів мононуклеарами периферичної крові *in vitro*.

Для дослідження використовували мононуклеарні клітини периферичної крові пацієнтів з АР та контрольної групи. Виділення мононуклеарних клітин проводили з використанням стандартного розчину на градієнті фікол-верографіну (1,076-1,078). Для визначення цитокін-продукуючої здатності мононуклеари крові після виділення в стандартному градієнті щільності фікол-верографіну тричі відмивали в середовищі 199 і ресуспендували в культуральному середовищі RPMI-1640, що містить 10% ембріональної телячої сироватки, 400 мкг/мл гентаміцину,  $5 \times 10^{-5}$  М2-меркаптоетанолу і 2 мл 3%-L-глутаміну. Клітинну суспензію в концентрації  $1,5 \times 10^6$  кл/мл інкубували 24 години в CO<sub>2</sub>-інкубаторі при 37°C без стимулюючого агента та в присутності фітогемаглютиніну (50 мкг/мл). По закінченні часу інкубації клітини осаджували центрифугуванням при 1600 об/хв. протягом 10 хвилин, відбирали супернатанти і зберігали до тестування при -20°C. Вміст цитокінів у супернатантах визначали за допомогою імуноферментного методу, згідно методики запропонованої виробником. Концентрацію цитокінів у сироватці крові досліджували з використанням наборів для імуноферментного аналізу – IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (IBL International, Німеччина). Оцінку результатів проводили за допомогою фотометра «Sunrise» (Австрія).

#### **2.2.4. Визначення популяцій і субпопуляцій лімфоцитів**

Оцінку кількості CD3, CD4, CD8, CD19, CD16+56, CD25, CD69, CDHLA-DR - лімфоцитів проводили за допомогою методу проточної цитофлуориметрії з використанням інструкції до наборів реагентів ("Beckman Coulter", США).

Метод ґунтується на взаємодії моноклональних антитіл, мічених флуорисцентними мітками, до поверхневих антигенів лімфоцитів і наступним аналізом зразків на проточному цитофлуориметрі. Забір крові в хворого проводився натщесерце з вени в пробірки з К<sub>3</sub>ЕДТА ("Becton Dickinson", США). У дві пробірки додавали по 50 мкл цільної крові пацієнта. У першу пробірку помістили 5 мкл CD3/CD8/CD45/CD4 моноклональних антитіл ("Beckman Coulter", США), у другу – 5 мкл CD3/CD16+56/CD45/CD19 моноклональних антитіл ("Beckman Coulter", США). Зразки перемішували на вортексі та інкубували в темноті 15 хв. при кімнатній температурі, уникаючи попадання прямого сонячного проміння. У кожену пробірку додавали 1 мл робочого лізуючого розчину ("Beckman Coulter", США). Перемішували на вортексі V-1 plus ("Biosan", США) й інкубували в темноті 10 хв. при кімнатній температурі. Аналіз зразків проводили на проточному цитометрі EPICS (США).

#### **Визначення кількості Treg-клітин**

Відсоток Treg-клітин (CD3+CD4+CD25+CD127<sup>low</sup>) визначали з використанням моноклональних антитіл: CD3-PerCP, CD4-APC, CD25-PECy7 і CD127-PE (BD™ Biosciences). Фенотипування клітин проводили з використанням проточного цитометра EPICS (США). Гейтування Т-регуляторних клітин проводили за CD3+CD4<sup>+</sup>- лімфоцитами.

#### **2.2.5. Статистична обробка**

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програм Microsoft Excel 2002, Statistica for Windows 6.0. Кількісні зміни представлені у вигляді медіани, середньоквадратичного відхилення (SD) та середнього арифметичного. Для перевірки розподілу на нормальність використовували тест Колмогорова-Смірнова. Для оцінки вірогідності отриманих результатів використовували t-критерій Стюдента. Відмінності вважали вірогідними при  $p < 0,05$  [5].

Для автоматизації оброблення даних було розроблено комплекс програм на мові програмування Python. Усі пацієнти були згруповані по областях, щоб

полегшити виділення просторових закономірностей. Для виявлення закономірностей сенсibiliзації булаздійснена бінаризація даних. Пороговим значенням сенсibiliзації до алергенів кліщів було визначене число 0,35 kU/L. Рівень сенсibiliзації 0.35 і вище замінено на 1, менші значення – на 0.

## РОЗДІЛ III

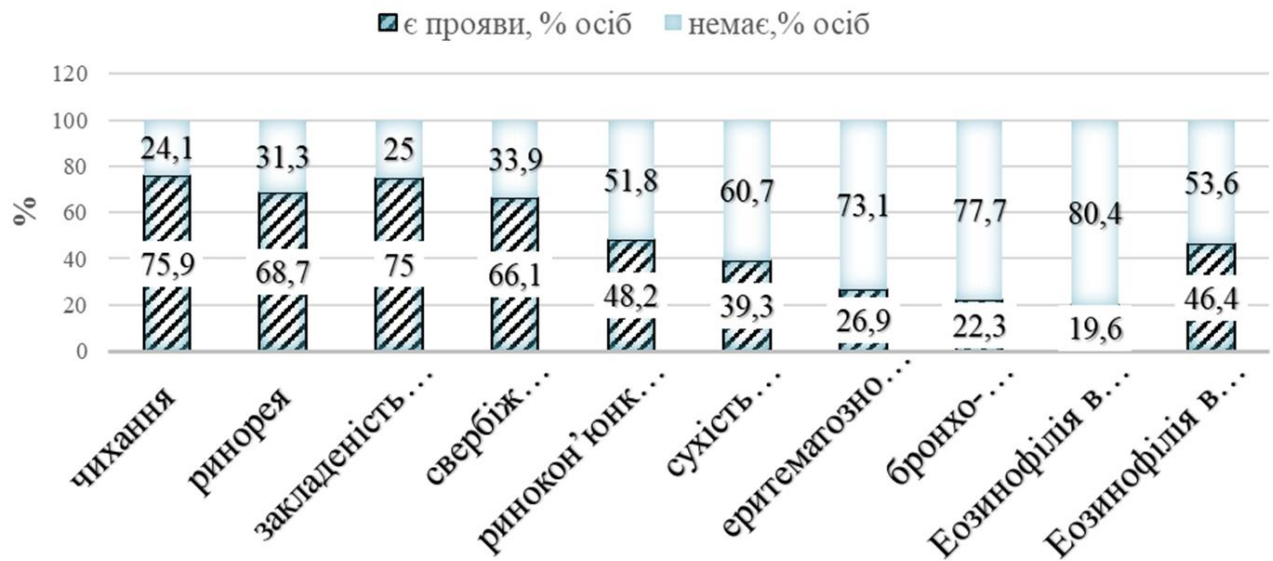
### КЛІНІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ТА ДІАГНОСТИКА АЛЕРГІЇ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ У ПАЦІЄНТІВ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ

#### 3.1. Клінічні прояви алергопатології у обстежених осіб

В останні десятиліття проблема алергії набуває все більшої актуальності. У першу чергу спостерігається ріст поширеності АЗ, особливо - в економічно та соціально розвинутих регіонах світу. Фахівці також констатують факти значного «омолодження» АЗ, тобто зміщення їх початку на більш ранній вік, зміну структури алергопатології, схильність до поширення тяжких клінічних форм, формування коморбідних станів тощо [31, 91].

Верифікацію алергопатології у 112 пацієнтів проводили за наступними клінічними ознаками: у 85 (75,9%) хворих були скарги на періодичне/постійне чихання, у 77 (68,7%) – на періодичну ринорею, у 84 (75,0%) – на закладеність носа, у 74 (66,1%) – на свербіж носа/очей, у 54 (48,2%) – на ринокон'юнктивіт, у 44 (39,3%) – на сухість шкірних покривів, у 29 (26,9%) – еритематозно-сквамозні висипання на шкірі верхніх кінцівок, верхньої частини грудної клітки, шиї тощо зі свербіжем, у 25 (22,3%) – на рецидивний бронхо-обструктивний синдром (БОС), (рисунок 3.1.1.).

У загальному аналізі крові (ЗАК) у 22 (19,6%) осіб виявлена еозинофілія легкого ступеня (від 0,6 до 1,5 Г/л). У мазку-відбитку слизової порожнини носа у 52 (46,4%) осіб виявлена збільшена кількість еозинофілів (від 17,00% до 75,00% у полізорі). Пацієнтам з БОС проведена оцінка функції зовнішнього дихання – в 15 хворих виявлені зміни у показниках спірометричних досліджень, які вказували на формування дихальної недостатності легкого ступеня за обструктивним типом.



**Рис. 3.1.1. Клінічні прояви алегопатології у обстежених осіб, n=112**

На підставі суб'єктивних і об'єктивних показників, результатів лабораторних і специфічних алергологічних досліджень пацієнтам були виставлені діагнози (рисунок 3.1.2).

Найчастіше серед обстежених пацієнтів був діагностований персистивний (цілорічний) АР, 31 (27,7%) осіб та інтермітивний (сезонний) АР, 29 (25,8%) осіб; найменше виявлено пацієнтів з БА інтермітуючою або легкою персистуючою, контрольованою – 4 осіб і коморбідність – БА інтермітуюча або легка персистуюча, контрольована/АР інтермітивний – 4 особи, що склало по 3,6%. Майже з однаковою частотою верифіковані БА інтермітуюча або легка персистуюча, контрольована/АР цілорічний – 7 (6,3%) пацієнтів і хронічна часто рецидивуюча кропив'янка – 8 (7,1%) осіб, а також атопічний дерматит (АД) дорослого типу, локалізована еритематозно-сквамозна форма, легкого ступеня тяжкості (SCORAD від 14,00% до 22,00%), неповна або повна ремісія – 14 осіб (12,5%) та коморбідність – АР персистивний і АД – 15 (13,4%) пацієнтів.

Обтяжений сімейний алергологічний анамнез щодо розвитку АЗ зафіксований у 61 особи (54,5%): в обох батьків у 4 (6,6%) осіб, у батька – 16 (26,2%), у матері – в 15 (24,6%), у близьких родичів – 26 (42,6%).

Структура встановлених діагнозів в обстежених осіб, %  
(n=112)

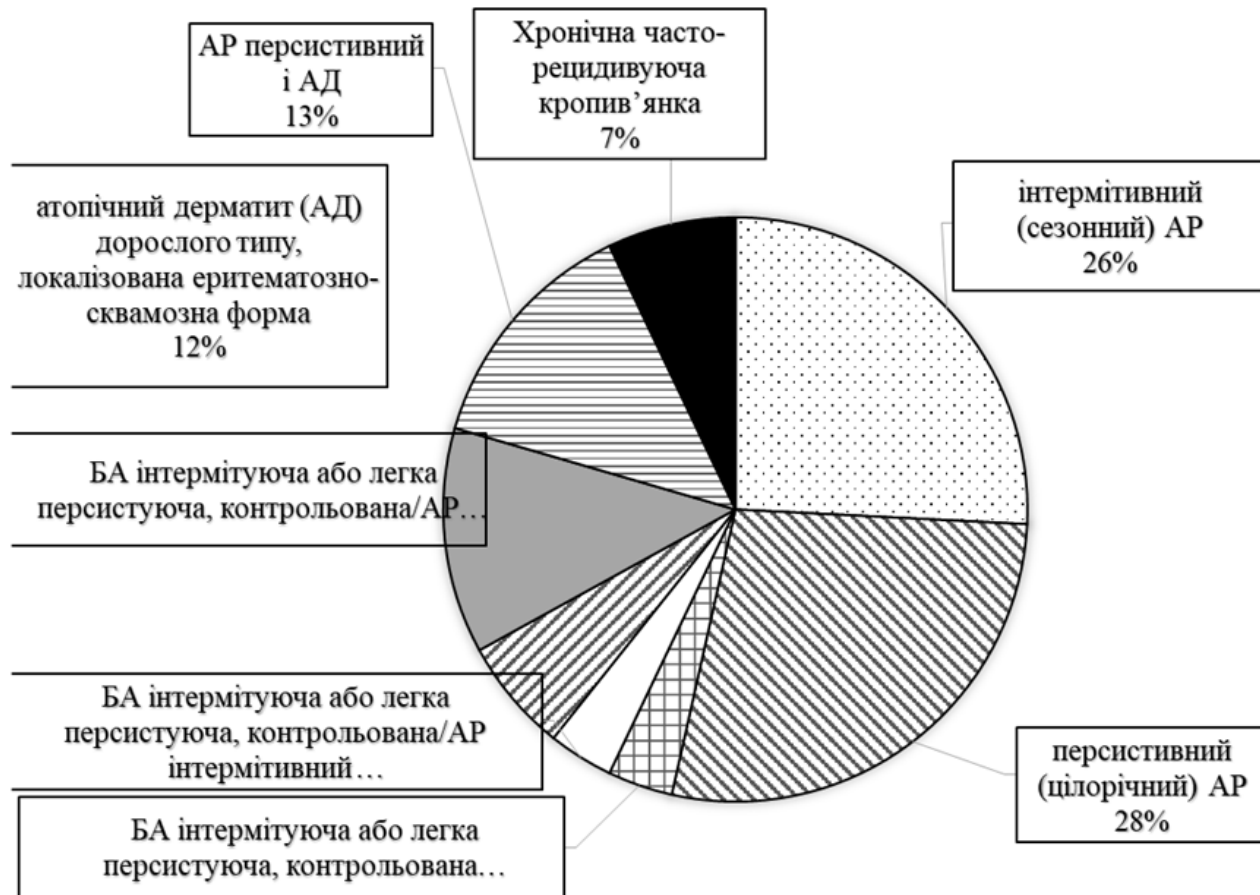


Рис. 3.1.2. Структура діагнозів у обстежених осіб, %

**3.2. Порівняльний аналіз *in vitro* та *in vivo* методів алергодіагностики алергії у обстежених осіб**

Вирішення проблеми діагностики алергії на сучасному етапі вимагає персоналізованих підходів через призму генотипування, визначення фенотипічних і ендотипічних особливостей пацієнта, вивчення регіональних характеристик сенсibiliзуючого профілю, розробку і використання нових імунобіологічних препаратів у тактиці лікування тощо. У такій ситуації особливо актуальним є пошук максимально ефективних, зручних у виконанні та економічно

вигідних методів діагностики алергії, що в свою чергу дозволить обґрунтувати вибір обсягу і тривалості терапії та сприятиме підвищенню її ефективності.

Завдяки прогресу в царині молекулярної біології за останні 30 років вдалося детально виявляти і охарактеризовувати окремі алергени на молекулярному рівні. На сьогоднішній день створені і регулярно поповнюються бази даних про алергени (наприклад, [www.allergen.org](http://www.allergen.org), [www.allergome.org](http://www.allergome.org)), де наведена повна інформація про них є цілком доступною для наукової і медичної спільноти. У даний час описано понад 3000 різних алергенів і понад 1400 ізоформ, де майже 1500 є рекомбінантними [6, 74]. Відтак, використання окремих алергенних молекул (замість екстрактів) запровадило нову область молекулярної діагностики алергії – «компонентну діагностику» та змінило наше розуміння профілів сенсibilізації і перехресних реакцій [9, 145, 147]. Сучасна молекулярна діагностика алергії має низку переваг, які дають вищу точність діагностики та дозволяють персоніфікувати процес лікування пацієнтів з прогнозуванням його ефективності [55].

Водночас така ситуація зовсім не зменшує значення шкірних методів алерготестування, які були і залишаються початковими методами діагностики структури сенсibilізації пацієнта [16]. Ці методи є швидкими і зручними для рутинного використання, однак мають низку недоліків. Зокрема, у дітей не завжди вдається їх застосувати через певні вікові особливості, нестійкі періоди ремісії, а також – у пацієнтів різного віку зі шкірними проявами в період загострення, з важкими реакціями в анамнезі, неможливістю відміни препаратів, які впливають на інтенсивність хвороби, ментальності та психічних особливостей людини чи поганому комплаєнсі хворого тощо.

Незважаючи на потенціал діагностичних можливостей, питання достовірності методів, економічної доцільності, технологічного забезпечення у рутинній клінічній практиці залишаються предметом дискусій.

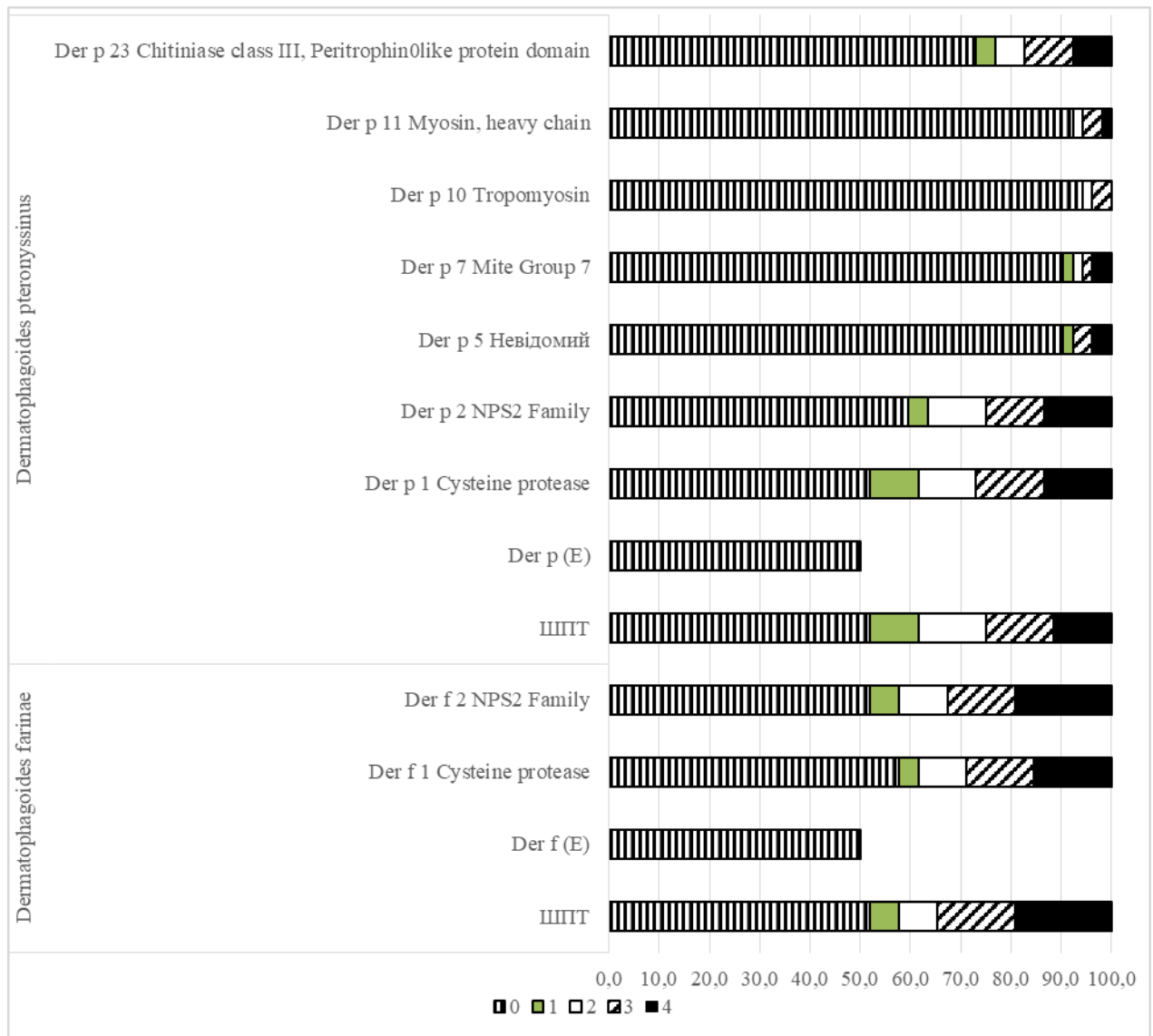
Метою нашої роботи було провести порівняльний аналіз альтернативних методів оцінки гіперчутливості до різних груп причинно-значимих алергенів у дорослих пацієнтів.

Для виконання поставленої мети була відібрана група пацієнтів у кількості 52 осіб з діагнозом АР, яким після проведення ШПТ стандартизованими екстрактами алергенів КДП виконували компонентні дослідження. Зауважимо, що хворим зі шкірними проявами в анамнезі ШПТ проводили у фазі ремісії.

За результатами ШПТ виявлено: у 25 хворих (48,1%) – виявлено сенсibilізацію до алергенів КДП *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Причому, у 36 (69,2%) пацієнтів виявлена полісенсibilізація. Розподіл моносенсibilізованих пацієнтів був наступним: 5 (9,6%) мали позитивні ШПТ лише до обох КДП, 3 (5,7%) – до тимофіївки лучної, 3 (5,7%) – до цвілевих грибків *A. Alternata*, 3 (5,7%) – до kota, 2 (3,8%) – до берези.

Результати вивчення шкірної гіперчутливості оцінювалися за схемою: проба негативна (0 клас/-), сумнівна (1 клас/+), позитивна (2 клас/++), виражена позитивна (3 клас/+++), гіперергічна (4 клас/++++). Вміст алергенспецифічних IgE до компонентів алергенів оцінювали наступним чином: алерген не визначається або від'ємний (<0,3 kU/L, клас 0); рівень IgE низький (0,3-1 kU/L, клас 1), середній рівень IgE (1-5 kU/L, клас 2), високий рівень IgE (5-15 kU/L, клас 3), дуже високий рівень IgE (>15 kU/L, клас 4). Результати досліджень подано на рисунках 3.2.1 та в таблиці 3.2.1.





**Рис. 3.2.1 Порівняльний аналіз результатів шкірних прик-тестів і компонентних досліджень до алергенів кліщів домашнього пилу (n=52)**

Таблиця 3.2.1

**Результати шкірних прик-тестів і молекулярних досліджень до алергенів  
кліщів домашнього пилу**

Алерген	Тест	Всього позитив.	0 клас	1 клас	2 клас	3 клас	4 клас
<b>Dermatophagoide s farinae</b>	<b>ШПТ</b>	25	27	3	4	8	10
	<b>Der f (E)</b>	26	26				
	<b>Der f 1</b> Cysteine protease	22	30	2	5	7	8
	<b>Der f 2</b> NPS2 Family	25	27	3	5	7	10
<b>Dermatophagoide s pteronyssinus</b>	<b>ШПТ</b>	25	27	5	7	7	6
	<b>Der p (E)</b>	26	26				
	<b>Der p 1</b> Cysteine protease	21	31	2	6	6	7
	<b>Der p 2</b> NPS2 Family	25	27	5	6	7	7
	<b>Der p 5</b> Невідомий	5	47	1	0	2	2
	<b>Der p 7</b> Mite Group 7	5	47	1	1	1	2
	<b>Der p 10</b> Tropomyosin	3	49	0	1	2	0
	<b>Der p 11</b> Myosin, heavy chain	4	48	0	1	2	1
<b>Der p 23</b> Chitiniase class III, Peritrophin like protein domain	14	38	2	3	5	4	

\* 0 можлива комбінація позитивних результатів

За результатами молекулярних досліджень у 48% обстежених осіб виявили позитивну реакцію до алергенів КДП, причому порівну до екстракту *Dermatophagoides farinae* (50,0%) і *Dermatophagoides pteronyssinus* (50,0%).

При порівнянні результатів ШПТ з результатами молекулярної діагностики звертає на себе увагу висока ступінь співпадіння результатів алергодіагностики цими двома методами. Зауважимо, що обґрунтований вибір АСІТ базується на виявленні у пацієнта мажорних компонентів [39, 61]. Відтак, порівнявши результати ШПТ з концентрацією найпоширеніших мажорних компонентів, ми

виявили, що для алергенів КДП *Dermatophagoides farinae* (**Der f 2**), *Dermatophagoides pteronyssinus* (**Der p 2**) розбіжностей не було.

Таким чином, найпоширенішими джерелами респіраторних алергенів у пацієнтів із сенсibilізацією до КДП були білки **Der f 2** (NPS2 Family) та **Der p 2** (NPS2 Family).

Порівняльний аналіз *in vitro* та *in vivo* методів алергодіагностики вказує на задовільну збіжність результатів при застосуванні більш економічно доступного метода дослідження – ШПТ. Без сумніву, ШПТ не володіють такою високою селективністю алергодіагностики, проте за сумарним результатом є достатньо надійними, що ще раз підкреслює їх багаторічну значущість як способу первинної діагностики сенсibilізації організму, а також економічну вигоду для пацієнта. Уточнення за молекулярним профілем може здійснюватися в подальшому за вибірковим принципом, особливо для пацієнтів з полісенсibilізацією чи прихованою сенсibilізацією, а також як високоточний, персоніфікований метод для вибору АСІТ і прогнозу її ефективності.

### **3.3. Визначення молекулярного профілю сенсibilізації до алергенів кліщів домашнього пилу**

Алергени КДП вважаються одними з найбільш поширених чинників астми та алергічного риніту у світі. Втім, як вважається, лише 1-2 % світової популяції має чутливість до алергенів кліщів. І хоча ця цифра, на перший погляд, здається незначною, насправді, алергічна чутливість до кліщів домашнього пилу значно варіює між країнами. Причому, у розвинених країнах показник алергічної чутливості до кліщів є набагато вищим. У країнах Європи він перевищує 20% і сягає 40% у деяких спільнотах Північній Америці. Серед дітей Тайваню, що мають алергію I типу, чутливість до кліщів становить понад 80% [22]. Крім того, є дані, що серед атопічної популяції, щонайменше 50% пацієнтів з бронхіальною астмою та 45% пацієнтів з алергічним ринітом мають сенсibilізацію до кліщів домашнього пилу [141].

Наразі, у світі відомі декілька видів кліщів домашнього пилу, що спричиняють алергічну сенсibilізацію. Найбільше з алергенних білків, 31 та 36 відповідно, мають кліщі *Dermatophagoides pteronyssinus* або європейський кліщ домашнього пилу та *Dermatophagoides farinae* – американський пиловий кліщ [6]. Обидва містять основні алергени – білки групи 1 і 2. Гомологія між двома видами кліщів дуже висока, і перехресні реакції поширені [27].

Основні з алергенних білків КДП входять до декількох класів: цистеїнові протеази (Der f 1, Der p 1, Der m 1, Eur m 1) – група 1, NPC2 family (Der f 2, Der p 2, Der m 2, Eur m 1) – група 2. Der p 10 та Der f 10 відносяться до тропоміозинів, Der p 15 та Der f 15 – до хітиназоподібних білків та хітиназ відповідно, а Der p 20 та Der f 20 складають групу аргинін-кіназ [6].

Основними алергенами з названих вважаються цистеїнові протеази Der p 1 та Der f 1, відповідно, *Dermatophagoides pteronyssinus* та *Dermatophagoides farinae*. Чутливими до останніх, за літературними даними, є більше 80% людей із алергією до КДП [27].

Втім, останнім часом значного клінічного значення набув ще один білок, Der p 23, який також називають мажорним компонентом кліща домашнього пилу [90]. Цей алерген є перитрофіноподібним білковим доменом (PF01607). Перитрофіноподібним протеїном є і Der f 23, а Der f 37 – це білок, що містить перитрофін-А домен [6].

Інші алергени кліщів, що мають клінічне значення, це Der p 5, Der p 7, та Der p 21. Причому, за літературними даними, найбільш виражені алергенні властивості з цього переліку має Der p 7 [29]. Втім, ці дані можуть бути релевантними лише для пацієнтів, для яких проводилося дослідження. Адже, як вважається, на швидкість сенсibilізації впливає кілька факторів, включаючи вік пацієнта, географічний регіон, полі- або моносенсibilізація, сенсibilізацію до певних джерел алергенів [92].

Відтак, різниця в чутливості населення до цих та інших алергенних компонентів кліщів визначає клінічний перебіг алергічного захворювання й

стратегії їх лікування. І хоча респіраторну алергію до кліщів домашнього пилу часто можна контролювати за допомогою симптоматичних ліків, у деяких пацієнтів не вдається досягти задовільного контролю над хворобою [92].

Саме цей факт визначає вибір лікування алергічної гіперчутливості до алергенів кліщів на користь АСІТ. Остання, своєю чергою, покладаючись на результати молекулярної діагностики алергії, дозволяє підібрати кандидатів на лікування та спрогнозувати ефективність алерген-специфічної імунотерапії в залежності від білкового алергену, до якого пацієнт сенсibilізований.

Таким чином, сьогодні доведено, що алергени КДП є важливими факторами розвитку алергічного риніту та бронхіальної астми. Втім, залишаються відкритими питання клінічної релевантності окремих алергенів щодо розвитку алергічного захворювання та вибору терапевтичної тактики [22].

Враховуючи вищенаведені факти про те, що конкретні терапевтичні підходи все ще не враховують профілі сенсibilізації пацієнтів [22], метою цієї роботи було визначення характеру сенсibilізації популяції України до окремих алергенних компонентів кліщів домашнього пилу для покращення тактики ведення пацієнтів з АІТ у різних регіонах.

Для визначення профілю сенсibilізації до КДП були отримані дані 16309 жителів 16 регіонів України, що, пройшли діагностику алергії за допомогою молекулярного тесту ALEX2. Пацієнти проживали в усіх географічних регіонах України – Лісовій, Лісостеповій та Степовій зонах. Найбільше протестованих пацієнтів, 19,62 %, проживали у столиці України м. Києві (Лісова зона), 14,48 % – у м. Одесі, 7,7 % – у м. Харкові (Степова зона), 7,55 % – у Дніпрі (Лісостеп).

Після первинної оцінки отриманої бази даних за географічною приналежністю та віком пацієнтів, до подальшого аналізу були включені дані 10651 осіб, регіон проживання та вік яких можна було встановити достеменно. Серед них було 6163 (57,86 %) дітей віком до 18 років та 4488 дорослих (42,14 %).

З включених у дослідження пацієнтів сенсibilізацію до алергенів кліщів домашнього пилу мали 2875 осіб, що становило 27% проаналізованої вибірки. Дітей серед них було у 2,26 разів більше, ніж дорослих: 1993 (69,32%) дітей та 882 (30,68 %) дорослих.

В профілях продіагностованих пацієнтів переважала сенсibilізація до алергену Der f 2. Вона спостерігалася або окремо, або у поєднанні з сенсibilізацією до інших алергенних молекул у 2106 або у 73,25 % пацієнтів, чутливих до алергенів КДП. Чутливість до алергену Der p 2 – моно- або у поєднанні з сенсibilізацією до інших алергенів, – спостерігалася у практично такої ж кількості пацієнтів – 2073 (72,10 %).

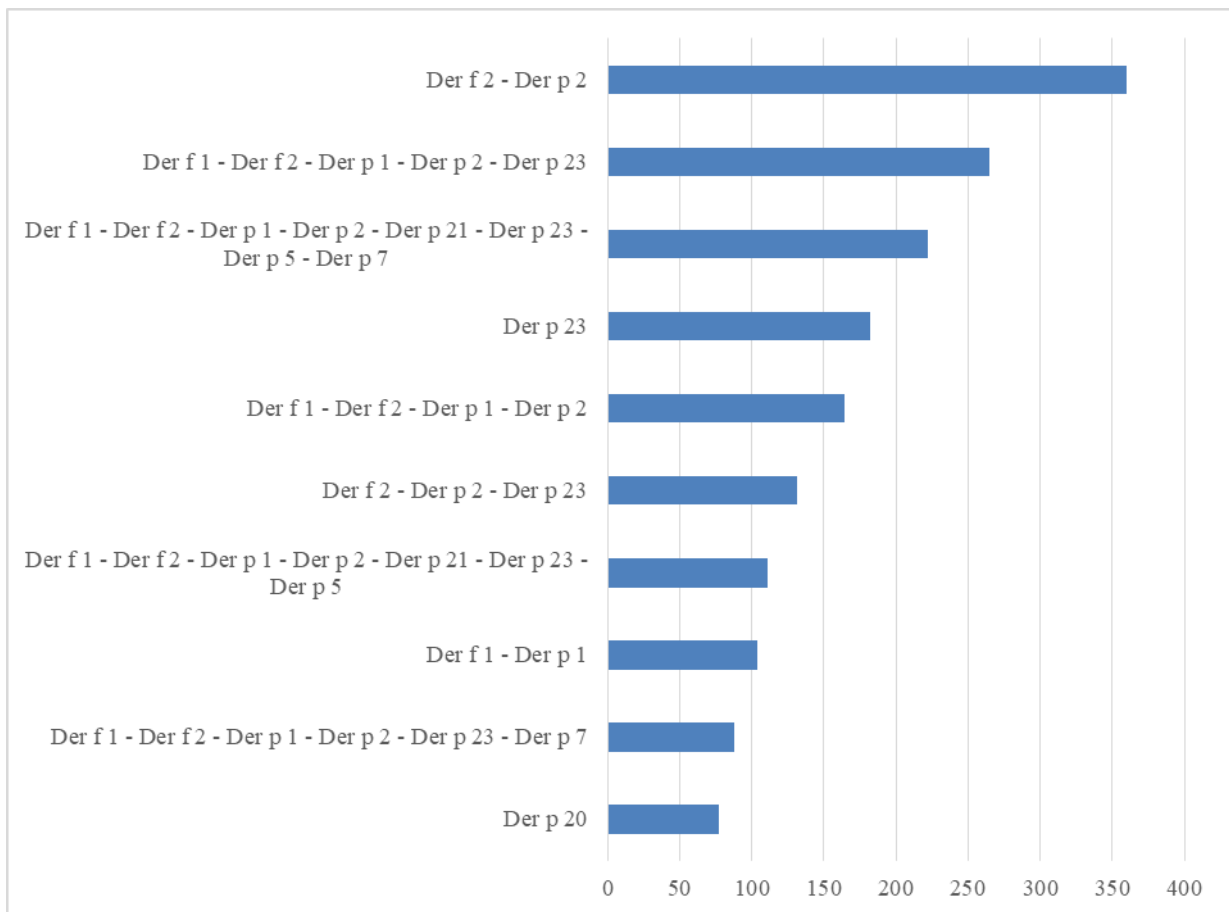
Наступною за частотою була сенсibilізація до алергену Der p 23 – у 1602 (55,72 %) пацієнтів. Сенсibilізацію до Der p 1 було виявлено у 1567 (54,50 %) пацієнтів, до Der f 1 – у 1553 (54,01 %) осіб.

Сенсibilізації до алергену Der p 21 була встановлена у 786 (27,34 %) пацієнтів, Der p 5 – 818 (28,45 %), Der p 7 – у 649 (22,57 %) людей. Найменша кількість пацієнтів мала сенсibilізацію до наступних алергенів: Der p 20 – 234 пацієнта (8,14 %), Der p 10 – 177 (6,16 %), Der p 11 – 16 пацієнтів (0,56 %).

Серед пацієнтів обох вікових груп найчастіше була виявлена одночасна сенсibilізація до Der f 2 та Der p 2, яка спостерігалася у 12,52 % обстежених. Ця сама сенсibilізація була й найбільш поширеною у кожній з вікових груп. Окремо серед дітей частота одночасної сенсibilізації до Der f 2 та Der p 2 становила 11,74 %, а серед дорослих – 14,29 %.

Наступним за поширеністю типом сенсibilізації всього населення України була одночасна чутливість зразу до п'яти молекул – алергенів групи 1 та групи 2 Der f 1, Der p 1, Der f 2, Der p 2 та до перитрофіноподібного білка Der p 23. Вона спостерігалася у 9,22 % пацієнтів. Третьою за поширеністю у всіх вікових групах була одночасна сенсibilізація до всіх мажорних молекулярних компонентів кліщів Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2, Der p 21, Der p 23, Der p 5, Der p 7. Вона спостерігалася у 7,72 % пацієнтів.

Наступною була моносенсибілізація до Der p 23. Вона спостерігалася у 6,33 %. Це була найпоширеніша моносенсибілізація серед пацієнтів всіх вікових груп. Наступною за поширеністю була моносенсибілізація до Der p 20. Але за частотою реєстрації вона була лише десятою і зустрічалася у 2,68 % пацієнтів (рис. 3.3.1).



**Рис.3.3.1. Відсутність одночасної сенсибілізації до різних комбінацій молекулярних алергенів КДП**

Моносенсибілізація до кожного з алергенів груп 1 та груп 2 зустрічалася у 0,14 % (0,05%-0,42%) (Der p 2) – 1,3 % (0,53%-1,82%) (Der f 1) пацієнтів. У дитячій віковій групі характер сенсибілізації був схожим на той, що спостерігався у загальній групі. Але у дітей четвертою за поширеністю була одночасна сенсибілізація до алергенів груп 1 та 2: Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2. Вона спостерігалася у 5,82 (5,28%-6,02%) % пацієнтів. Моносенсибілізація до Der p 23 спостерігалася у 5,37 (5,12%-5,99%) % випадків. Моносенсибілізація до Der f 1 та

до Der p 1 спостерігалась у 1,51 % (1,25%-1,78%) – 0,55 % (0,25%-0,82%) пацієнтів, відповідно.

У дорослих другою за поширеністю, після одночасної сенсibilізації до Der f 2 та Der p 2, була моносенсibilізація до Der p 23. Вона реєструвалась у 8,5 % (8,15%-8,92%) пацієнтів. Одночасна сенсibilізація до алергенів груп 1 та 2 й до Der p 23 спостерігалася у 7,48 % (7,25%-7,52%) людей, старших 18 років.

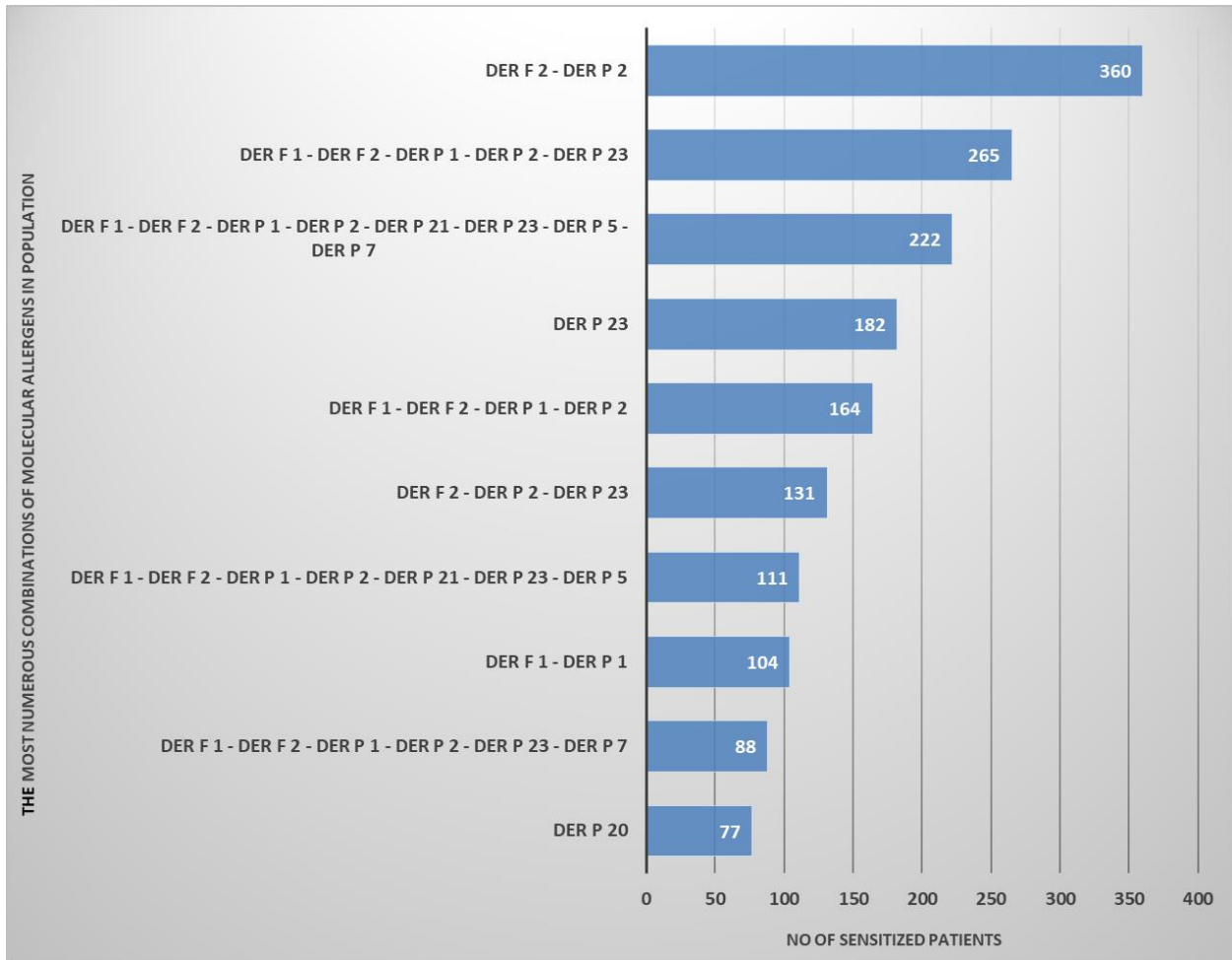
Наступною за частотою моносенсibilізації до мажорних алергенів була чутливість до Der f 2 - 2,04% (1,95%-2,09%). Вона зустрічалась так само часто, як і одночасна чутливість до Der f 1 та Der p 1. Моносенсibilізація до цих алергенів зустрічалася з частотою 0,34% (0,25%-0,42%) (Der p 1) – 0,91 % (0,84%-1,05%) (Der f 1).

У розрізі регіонів найчастіше реєструвалася одночасна сенсibilізація до Der f 2 та Der p 2. Вона спостерігалась у 14 регіонах з 16 обстежених. У двох регіонах західної України (Закарпатська та Хмельницька області) найбільш частою була сенсibilізація до Der p 23.

Сенсibilізація до Der f 2 найчастіше зустрічалася у 2 регіонах – у Дніпропетровській (Центр) та в Закарпатській областях (Захід). Сенсibilізація до Der p 23 була найбільш частою у Полтавській (Схід) та Херсонській (Південь) областях. Серед дорослих Житомирської, Хмельницької та Рівненської областей (Західна Україна) не спостерігалось пацієнтів, сенсibilізованих до КДП. У Черкаській області (Центр) найбільш вираженою була полісенсibilізація до 7 молекул: алергенів груп 1 та 2, а також до молекул Der p 20, Der p 21, Der p 23.

В решті областей найбільш частою була одночасна гіперчутливість до Der f 2 та Der p 2 (рис. 3.3.2).





**Рис. 3.3.2 Особливості одночасної сенсibiliзації до алергенів кліщів домашнього пилу.**

Таким чином, результати дослідження показали, що сенсibiliзація до алергенів КДП в Україні частіше зустрічається в дітей, ніж в дорослих. В цілому серед населення України, а також окремо серед дорослих і серед дітей найчастіше зустрічалась сенсibiliзація до алергенів групи 2 – Der f 2 та Der p 2. Наступною за частотою прояву була полісенсibiliзація до алергенів груп 1 та 2 та до Der p 23, а пацієнти, що мають сенсibiliзацію до Der p 5, 7, 20, 21 зустрічаються доволі рідко. Однак відмічені регіони України, в яких найпоширенішою є сенсibiliзація до алергену Der p 23. Це ще раз підтверджує дані щодо важливості визначення сенсibiliзації саме до цієї молекули, як до ще одного мажорного компонента кліщів, який має важливе терапевтичне значення.

Встановлений характер популяційної сенсibiliзації до КДП в Україні, в цілому, є хорошим прогностичним маркером ефективності АІТ, позаяк сучасні

екстракти для її проведення націлені на вироблення толерантності, здебільшого, до алергенів груп 1 та 2, і, меншою мірою, до Der p 23.

Позаяк виявлений характер сенсibilізації відрізняється у дітей і у дорослих, а також у різних географічних регіонах України, встановлені закономірності слід враховувати для вибору стратегії АСІТ та для прогнозу її ефективності як у регіональному розрізі, так і у окремих пацієнтів.

#### **3.4. Порівняльний аналіз *in vitro* та *in vivo* методів алергодіагностики алергії у обстежених осіб із алергією до кліщів домашнього пилу з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР**

Враховуючи попередні дані дослідження, де найчастіше серед обстежених пацієнтів був діагностований персистивний (цілорічний) АР, (у 31 осіб (27,7%), а серед найпоширеніших джерел респіраторних алергенів у пацієнтів були пилки злакових трав та алергени кліщів домашнього пилу, наступним етапом нашого дослідження було проведення порівняльного аналізу альтернативних методів оцінки гіперчутливості у осіб із алергією до кліщів домашнього пилу з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР.

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що серед двох груп пацієнтів з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР розбіжностей за кількістю позитивних шкірних тестів і визначенням специфічних IgE до екстрактів алергенів КДП виявлено не було (табл.3.4.1. -3.4.2).

За даними таблиці 3.4.1. та таблиці 3.4.2 при порівнянні результатів ШПТ з результатами молекулярної діагностики звертає на себе увагу висока ступінь співпадіння результатів алергодіагностики цими двома методами. Розбіжностей результатів досліджень між двома групами осіб виявлено не було.

Таблиця 3.4.1

**Результати шкірних прик-тестів і молекулярних досліджень до алергенів кліщів домашнього пилу у осіб з IgE-залежною формою АР**

		<b>Всього позитивних</b>	<b>1</b> 0,3-1 kU/L	<b>2</b> 1-5 kU/L	<b>3</b> 5-15 kU/L	<b>4</b> >15 kU/L
<b>Dermatophagoides farinae</b>	<b>ШПТ</b>	30	2	3	12	13
	<b>Der f (E)</b>	30	1	4	21	4
	<b>Der f 1</b> Cysteine protease	30	1	10	14	5
	<b>Der f 2</b> NPS2 Family	25	2	9	10	4
<b>Dermatophagoides pteronyssinus</b>	<b>ШПТ</b>	30	-	5	7	18
	<b>Der p (E)</b>	30	2	2	20	6
	<b>Der p 1</b> Cysteine protease	30	1	12	12	5
	<b>Der p 2</b> NPS2 Family	26	1	3	17	5
	<b>Der p 5</b> Невідомий	6		3	3	-
	<b>Der p 7</b> Mite Group 7	5	2	3	-	-
	<b>Der p 10</b> Tropomyosin	2	2	-	-	-
	<b>Der p 11</b> Myosin, heavy chain	4	3	1	-	-
	<b>Der p 23</b> Chitinase class III, Peritrophinlike protein domain	5	3	2	-	-

Таблиця 3.4.2

## Результати шкірних прик-тестів і молекулярних досліджень до алергенів кліщів домашнього пилу у осіб з IgE-незалежною формою АР

		Всього позитивних	1 0,3-1 kU/L	2 1-5 kU/L	3 5-15 kU/L	4 >15 kU/L
<b>Dermatophagoides farinae</b>	ШПТ	30	3	7	14	17
	Der f (E)	30	2	6	19	3
	Der f 1 Cysteine protease	29	2	9	14	4
	Der f 2 NPS2 Family	20	2	6	8	4
<b>Dermatophagoides pteronyssinus</b>	ШПТ	30	-	1	13	16
	Der p (E)	30	1	3	19	7
	Der p 1 Cysteine protease	30	2	9	13	6
	Der p 2 NPS2 Family	27	1	5	15	6
	Der p 5 Невідомий	7		3	4	-
	Der p 7 Mite Group 7	4	2	2	-	-
	Der p 10 Tropomyosin	1	1	-	-	-
	Der p 11 Myosin, heavy chain	5	3	2	-	-
Der p 23 Chitinase class III, Peritrophinlike protein domain	5	3	2	-	-	

Зауважимо, що обґрунтований вибір алергенімунотерапії до КДП базується на виявленні у пацієнта мажорних компонентів [8]. Відтак, порівнявши результати ШПТ з концентрацією найпоширеніших мажорних компонентів, ми виявили, що для КДП *Dermatophagoides farinae* (Der f 2), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 2) у двох досліджуваних групах, розбіжностей виявлено не було.

Окрім того, крім найбільш поширених головних компонентів алергенів КДП Der p 1, Der p 2 і Der f 1, Der f 2 спостерігали сенсibilізацію і до інших

компонетів КДП. Зокрема у пацієнтів з алергією до КДП виявляли сенсibilізацію до Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 11 та Der p 10. Сенсibilізація до даних компонентів виявлялась у двох досліджуваних групах пацієнтів.

Важливим є те, що Der p 7 є мажорним алергеном кліщів домашнього пилу поряд з Der p 1 і Der p 2. Більш ніж у 50% пацієнтів з кліщовим алергеном визначаються специфічні IgE-антитіла до Der p 7, який здатний стимулювати вироблення специфічних IgE-антитіл в тій ж мірою, що і Der p 2 [85].

За результатами проведених досліджень у групи осіб з IgE-залежною формою АР, в основному сенсibilізація до КДП спостерігалась до компонентів Der p 1, Der p 2 і Der f 1, Der f 2 (82%), а сенсibilізація до Der p 5, Der p 7, Der p 11 спостерігалась рідше і становила 32% серед обстежених пацієнтів. Сенсibilізація до перехресно-реактивного алергену Der p 10 зустрічалась лише у 2% пацієнтів. За рівнем визначення специфічних антитіл серед обстежених пацієнтів рівень специфічних IgE до компонентів алергенів в більшості випадків знаходився в межах 5-15 kU/L. Така ж тенденція спостерігалась у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР.

З огляду на все вищесказане, головними алергенами кліщів домашнього пилу є Der p 1 (цистеїнова протеаза) і Der p 2 (сімейство NPC2). Більш ніж у 80% пацієнтів, що сенсibilізовані до кліщів домашнього пилу, в сироватці визначаються специфічні IgE-антитіла до одного або двох компонентів. Таким чином, Der p 1 і Der p 2 можуть бути маркерами специфічної сенсibilізації і, в подальшому критерієм необхідності проведення АСІТ.

Результати дослідження представлені у наступних публікаціях [Зубченко С., Чопяк В., Колінковський О., Юр'єв С., Шарікадзе О. Порівняльний аналіз альтернативних методів діагностики профілю сенсibilізації пацієнтів Західного регіону України [Імунологія та алергологія: наука і практика. -2019. - № 3. - С. 45-59. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_3\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_3_7).].

## РОЗДІЛ ІV

### СТАН СИСТЕМНОЇ КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ПАЦІЄНТІВ НА АЛЕРГІЧНИЙ РИНИТ ІЗ СЕНСИБІЛІЗАЦІЄЮ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ

#### **4.1. Оцінка стану системної клітинної імунної відповіді у пацієнтів на алергічний риніт із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.**

АР викликає запалення слизової оболонки носа при повторному попаданні аероалергену у сенсibilізованих осіб. На розвиток цього захворювання має значення вплив алергену, а також імунологічні і генетичні фактори. Однак молекулярні механізми, які лежать в основі запального процесу, який викликає алергію, до кінця не з'ясовані. Основна рання імунна фаза характеризується IgE опосередкованим вивільненням попередньо утвореного гістаміну із активованих тучних клітин, що призводить до посилення регуляції прозапальних цитокінів і молекул адгезії. Пізня фаза характеризується вивільненням заново утворених медіаторів таких, як лейкотрієни, і активацією ефektorних клітин рекрутованих із лімфоїдної тканини і циркулюючої крові. Показано, що циркулюючі лейкоцити і їх підгрупи суттєво відрізняються в крові пацієнтів з АР і здорових осіб. Таким чином, місцеве запалення слизової оболонки носа при дії алергену викликає системні запальні реакції [20].

Таким чином, цікавим було б оцінити стан системного клітинного імунітету у пацієнтів з різними формами АР сенсibilізованих до кліщів домашнього пилу для з'ясування можливих патогенетичних відмінностей у цих групах хворих. Необхідно відзначити, що комплексних досліджень щодо зміни кількості імунокомпетентних клітин периферичної крові у хворих АР виявилось не достатньо або вони носили різноспрямований характер. Також відсутні дані про дослідження щодо особливостей кількісних змін чисельності клітин імунної системи при IgE-залежній і IgE-незалежній формі АР.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було оцінити стан клітинного імунітету у пацієнтів з АР сенсibiliзованих до кліщів домашнього пилу для з'ясування додаткових диференційних критеріїв, що дозволять розмежувати ІgЕ-залежну і ІgЕ-незалежну форму захворювання, що в подальшому може стати мішенню для нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

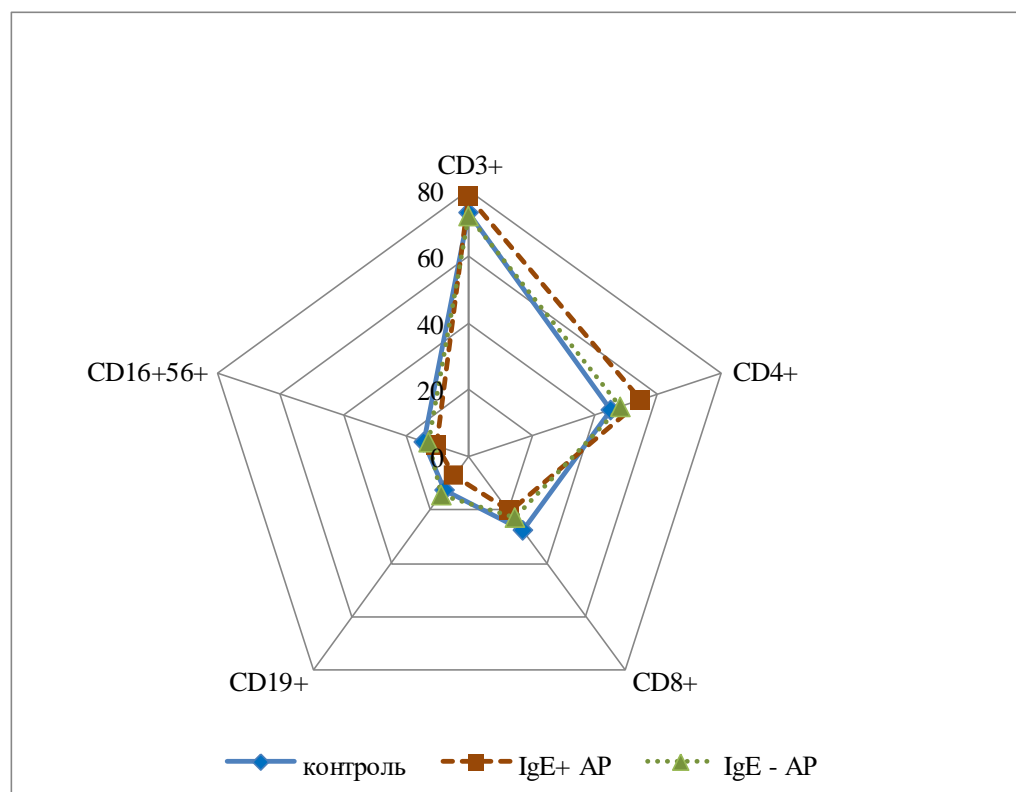
Аналіз стану показників клітинної ланки імунної системи у осіб з ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формою АР представлений на рис. 4.1.1. Згідно проведених нами досліджень, було встановлено, що у групі осіб з ІgЕ залежною формою АР загальна кількість CD3+ Т-лімфоцитів у відсоткових значеннях становила  $78,1 \pm 3,76\%$ , що практично не відрізнялось від значень у групі контрольних осіб  $73,2 \pm 5,54\%$ . Однак, у абсолютних значеннях встановлено тенденцію до зниження числа CD3+ Т-лімфоцитів до  $1,36 \pm 0,18$  Г/л проти  $1,86 \pm 0,44$  Г/л у групі контрольних осіб. Водночас серед субпопуляцій Т-лімфоцитів відмічали певний дисбаланс у співвідношенні CD4+Т-лімфоцитів хелперів і CD8+Т-лімфоцитів супресорів/цитотоксичних. Так, число CD4+-лімфоцитів становило  $54,6 \pm 5,12\%$ , що було вищим проти групи контрольних осіб, де встановлено  $46,2 \pm 4,78\%$  CD4+-лімфоцитів. Однак у абсолютних значеннях вірогідних відмінностей виявлено не було  $0,90 \pm 0,19$  Г/л і  $0,76 \pm 0,09$  Г/л відповідно. У той же час кількість CD8+-лімфоцитів також була зниженою лише у відсоткових значеннях і становила  $20,8 \pm 4,56\%$  проти  $27,5 \pm 3,59\%$  у групі контрольних осіб. Зміна співвідношення Т-лімфоцитів хелперів та Т-лімфоцитів супресорів/цитотоксичних відображена у підвищенні імунорегуляторного індексу CD4/CD8 порівняно із групою контрольних осіб ( $2,16 \pm 0,55$  і  $1,94 \pm 0,08$  відповідно).

При оцінці аналогічних показників у групі осіб з ІgЕ-незалежною формою АР також виявлено деякі зміни серед популяцій лімфоцитів. Зокрема, показано підвищення числа CD4+Т-лімфоцитів хелперів до  $48,2 \pm 5,75\%$  та зниження CD8+-лімфоцитів до  $23,1 \pm 3,02\%$ , однак у абсолютних значеннях вірогідних відмінностей

не було виявлено. Також, було встановлено підвищення імунорегуляторного індексу CD4/CD8 до  $1,94 \pm 0,51$ . Однак, вірогідних відмінностей їх кількості між групою осіб з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР також не було виявлено.

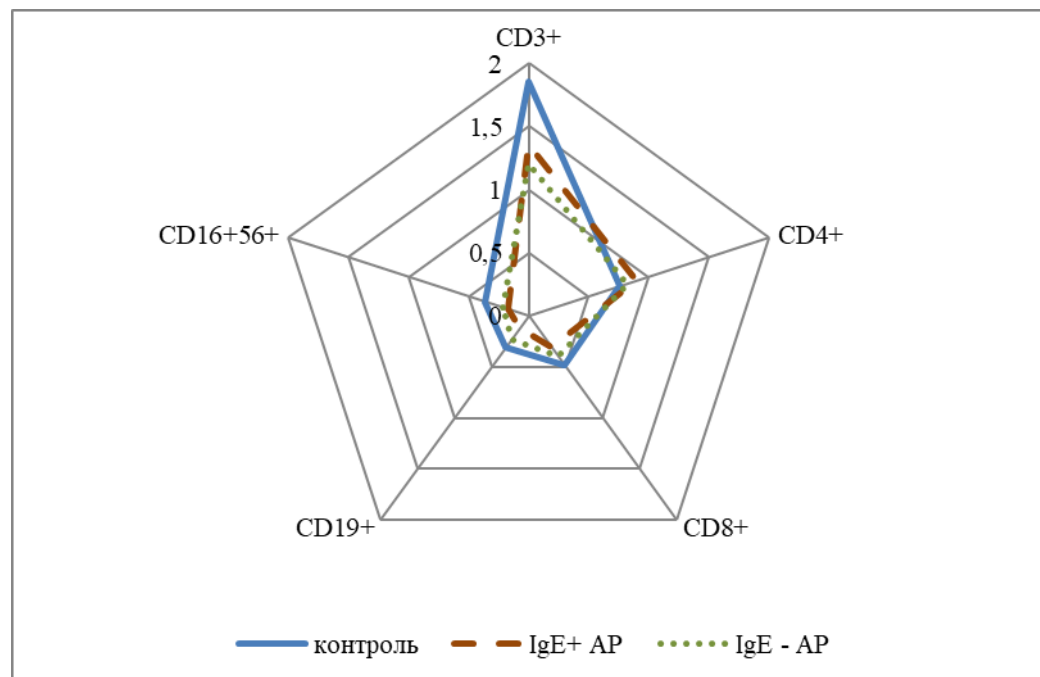
Щодо кількості CD19 В-лімфоцитів, то у групі осіб з IgE-залежною формою АР встановлено зниження їх кількості у абсолютних і відносних значеннях до  $7,6 \pm 3,92\%$  і  $0,12 \pm 0,10$  Г/л відповідно у порівнянні з групою контрольних осіб, де їх значення встановлено на рівні  $12,5 \pm 3,68\%$  і  $0,31 \pm 0,09$  Г/л ( $p < 0,05$ ). У групі з IgE-незалежною формою АР змін числа В-лімфоцитів не було виявлено, у порівнянні з групою контрольних осіб  $14,5 \pm 2,24\%$  і  $0,23 \pm 0,02$  Г/л відповідно.

Число CD16+56 НК-лімфоцитів було нижчим у відсоткових і абсолютних значеннях у групі з IgE-залежною формою АР у порівнянні з групою контрольних осіб і становило  $10,2 \pm 2,16\%$  і  $0,17 \pm 0,04$  Г/л відповідно проти  $14,2 \pm 3,52\%$  і  $0,36 \pm 0,02$  Г/л у групі контрольних осіб ( $p < 0,05$ ). Однак вірогідних відмінностей їх кількості між групою осіб з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР не було виявлено.





А.



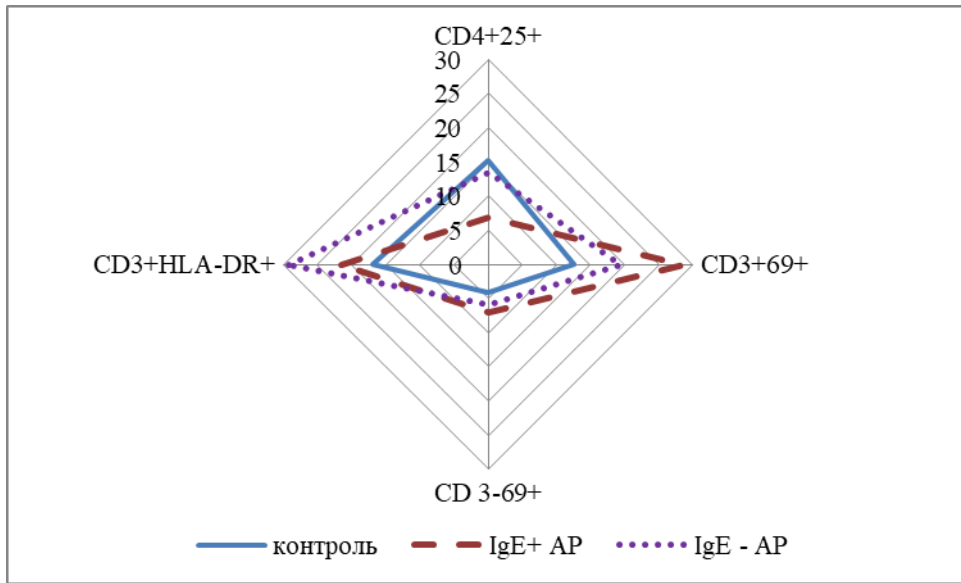
Б.

**Рис.4.1.1. Показники клітинної ланки імунної системи у пацієнтів на АР. (А) відсоткові значення показників, (Б) абсолютні значення показників ( $M \pm m$ ).**

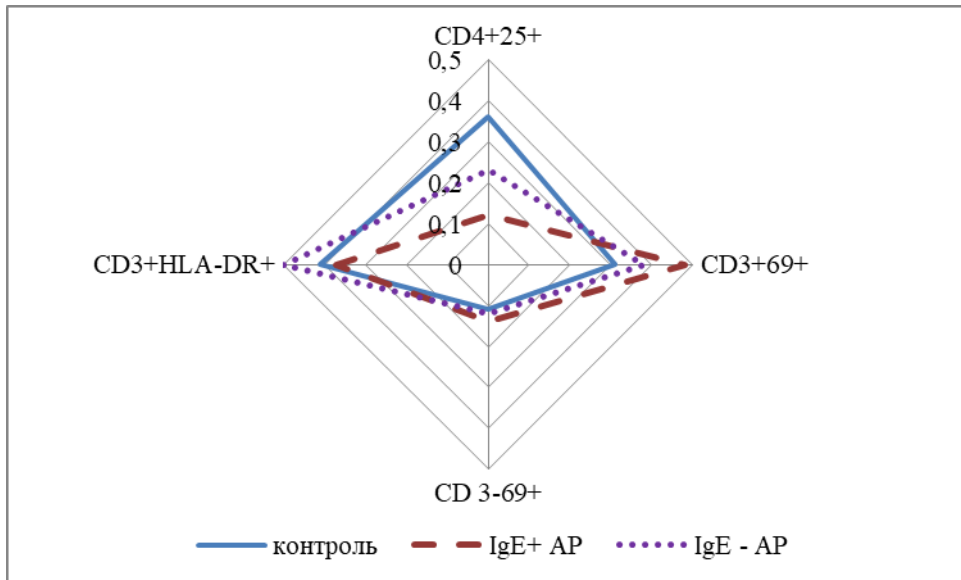
З огляду на виявлені нами зміни в кількісному складі популяцій і субпопуляцій лімфоцитів, доцільним було вивчити і експресію основних активізаційних маркерів на лімфоцитах у осіб з різними формами АР. Результати досліджень представлені на рис. 4.1.2. Аналізуючи дані, отримані при проведеному дослідженні, було встановлено вірогідне зниження кількості  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127_{low}$  Т регуляторних лімфоцитів у групі осіб з IgE-залежною формою АР до  $6,8 \pm 0,9\%$  проти  $15,3 \pm 2,6\%$  у контрольній групі осіб ( $p < 0,05$ ). При цьому, зниження кількості цих клітин було зафіксовано не тільки у відсоткових, а і у абсолютних значеннях  $0,12 \pm 0,02$  Г/л і  $0,36 \pm 0,08$  Г/л відповідно ( $p < 0,05$ ). Тоді як в групі з IgE-незалежною формою АР вірогідних змін рівня Т-регуляторних лімфоцитів виявлено не було. Рівень Т-регуляторних лімфоцитів становив  $12,5 \pm 1,3\%$  проти  $15,3 \pm 2,6\%$  у групі контрольних осіб.

Звертає на себе увагу і вміст CD3+CD69+ активованих Т-лімфоцитів. Встановлено підвищення рівня активованих клітин майже у 2 рази до  $28,6 \pm 2,1\%$  проти  $12,5 \pm 2,3\%$  у групі контрольних осіб ( $p < 0,05$ ). Експресія маркера CD69 була підвищена і на інших видах клітинах. В результаті проведених досліджень було показано, що кількість CD3-CD69+ була також вірогідно підвищеною до  $17,07 \pm 4,09\%$  лише у групі осіб з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ ). Однак у абсолютних значення вірогідних змін рівня CD3-CD69+ виявлено не було, як у групі з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР  $0,14 \pm 0,04$  Г/л і  $0,12 \pm 0,02$  Г/л відповідно проти  $0,11 \pm 0,02$  Г/л у групі контрольних осіб. Аналогічну тенденцію мав і рівень CD3+HLA-DR+ активованих лімфоцитів  $21,4 \pm 4,7\%$  проти  $16,9 \pm 1,82$  у групі контрольних осіб ( $p < 0,05$ ). При цьому вірогідне підвищення експресії HLA-DR на Т-лімфоцитах у двох дослідних групах.

При порівнянні отриманих даних між двома дослідними групами вірогідну відмінність було виявлено за рівнем експресії CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> Т регуляторних лімфоцитів та CD3+CD69 -лімфоцитів. У групі з IgE-залежною формою АР рівень Т-регуляторних лімфоцитів був вірогідно нижчим і становив  $6,8 \pm 0,9\%$  у порівняння з групі з IgE-незалежною формою АР, де рівень Т-регуляторних лімфоцитів становив  $13,5 \pm 1,3\%$  ( $p < 0,05$ ). Ця закономірність прослідковувалась як у відносних, так і абсолютних значеннях  $0,12 \pm 0,02$  Г/л і  $0,23 \pm 0,06$  Г/л відповідно, ( $p < 0,05$ ). Рівень CD3+CD69 –лімфоцитів був вірогідно вищим лише у відсоткових значеннях у групі з IgE-незалежною формою АР і становив  $28,6 \pm 2,1\%$  проти  $19,4 \pm 3,4\%$  ( $p < 0,05$ ).



А.



Б.

**Рис.4.1.2. Вміст активованих субпопуляцій лімфоцитів крові у пацієнтів на АР (А) відсоткові значення показників, (Б) абсолютні значення показників (M±m).**

Таким чином, отримані нами результати відображають, що як у групі пацієнтів з IgE-залежною, так і IgE-незалежною формою АР з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу спостерігаються системні порушення стану імунної системи, однак вірогідних змін рівня цих показників виявлено не було. У групі пацієнтів IgE-залежною формою АР окрім підвищеної кількості Т-лімфоцитів

хелперів, зафіксовано зниження NK-клітин та вірогідне зниження кількості Treg-лімфоцитів регуляторних. Оцінка активізаційних маркерів показала посилення експресії CD69, HLA-DR на T-лімфоцитах, а у пацієнтів з IgE-залежною формою АР і, ймовірно, на NK-клітинах. Тоді як кількість Treg лімфоцитів була вірогідно зниженою лише у пацієнтів з IgE-залежною формою АР. Отримані результати потребують подальшого дослідження, що надалі може стати мішенню для нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

#### **4.2. Оцінка цитокінового профілю у пацієнтів на алергічний риніт , що викликаний сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу**

Патогенетичні механізми розвитку АР на сьогодні залишаються предметом дискусій. Відомо, що T-лімфоцити є одними із ключових факторів, які регулюють і координують імунні реакції при АР. При цьому T-лімфоцити хелпери 1 типу (Th1) синтезують цитокіни IFN $\gamma$  і IL2, які володіють супресивним впливом на синтез IgE, а T-лімфоцити хелпери 2-го типу (Th2) приймають участь в IgE-опосередкованому алергічному запаленні [16].

Достатньо добре вивченими є механізми атопічного IgE -залежного АР. Відомо, що після попадання на слизову оболонку носа алергени захоплюються антигенпрезентуючими клітинами, обробляються і представляються Th2 лімфоцитам. Активовані Th2 вивільняють прозапальні цитокіни IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, що приводить до синтезу IgE. В-клітини при цьому основними медіаторами синтезу IgE є цитокіни IL-4 і IL13. Серед яких IL-4 служить фактором росту і диференціації В лімфоцитів, стимулює синтез IgE, дозрівання тучних клітин, а IL-13 посилює експресію CD23, CD72 і антигенів HLA II класу на В-лімфоцитах, стимулює проліферацію В-лімфоцитів і синтез IgE [121]. Тим не менш, на сьогодні відомо, що теорія дисбалансу Th2/Th1 є не єдиною причиною, яка веде до надмірної активації Th2 лімфоцитів. Дослідження останніх років

доводять важливу роль Tregs лімфоцитів в регуляції імунної відповіді, в тому числі, і при алергії. Tregs лімфоцити є ключовим регуляторним механізмом, за рахунок якого організм підтримує імунну толерантність до зовнішніх антигенів і запобігає надмірній активації Th2 лімфоцитів, за рахунок синтезу імуносупресивних цитокінів IL-10, TGF- $\beta$  та IL-35 [15, 17,78].

Однак нещодавні дослідження показали, що існують і інші не-IgE-залежні механізми, які сприяють розвитку АР [17, 88]. На сьогодні відомо, що алергени завдяки своїй ферментативній протеолітичній активності можуть безпосередньо активувати епітеліальні клітини і в кінцевому результаті приводити до Th2-залежної імунної відповіді, викликаючи запалення дихальних шляхів [14]. Також, нещодавно стало відомо, що деякі алергени можуть безпосередньо впливати на синтез прозапальних цитокінів або індукувати синтез цитокінів епітеліальними клітинами. Клітини епітелію під впливом різних тригерних факторів, в тому числі і алергенів, синтезують IL-33, IL-25, TSLP, які впливаючи на активність «вроджених лімфоїдних клітин» типу 2 (ВЛК 2 типу), спонукають їх до синтезу тих же цитокінів, що і продукують Th2-лімфоцити - IL-5, IL-13, які в подальшому також активують В-лімфоцити і викликають синтез IgE [46, 61, 120]. Саме підвищення рівня ВЛК 2 типу спостерігали в периферичній крові хворих з АР сенсibiliзованих до кліщів домашнього пилу. При цьому їх рівень корелював із важкістю АР [125]. Інше дослідження продемонструвало, що алергени кліщів домашнього пилу індукують синтез IL-33 та IL-25 [139], які в свою чергу впливають на активність ILC2, що в результаті призводить до розвитку алергічних захворювань.

Вплив алергенів кліщів домашнього пилу тісно пов'язують з розвитком АР, бронхіальної астми та атопічного дерматиту [62]. Вважають, що кліщі роду *Dermatophagoides*, такі як *D. pteronyssinus* (*Der p*) і *D. farinae* (*Der f*), є найбільш важливими джерелами алергенів пов'язаних з розвитком бронхіальної астми. На сьогодні відомо більше 30 білків, які продукують КДП, які індукують синтез IgE у осіб з алергією [49]. Існують домінантні антигени, які відносять до груп алергенів

1 та 2, які можуть складати основну частину екстракту всіх алергенних білків кліщів домашнього иполу [61]. Серед алергенів *D. pteronyssinus* *Der p 1* належить до сімейства *papain*-подібних цистеїнових протеаз [126]. Вважають, що ця протеолітична активність приймає участь в патогенезі алергії шляхом збільшення проникливості епітеліальних клітин та забезпечує проходження їх власних і інших алергенів через епітелій [139]; а також шляхом впливу на функцію базофілів, опасистих клітин, альвеолярних макрофагів і епітеліальних клітин дихальних шляхів. Деякі автори вважають, що *Der p1* та інші *Der p* антигени здатні безпосередньо індукувати вивільнення прозапальних цитокінів і хемокінів із бронхіальних епітеліальних клітин людини [10].

Таким чином, вищезгадані цитокіни є ефективними молекулами в формуванні алергічної імунної відповіді. Однак патогенетичні механізми їх складної взаємодії залишаються ще не до кінця вивченими.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було оцінити цитокіновий профіль сироватки крові пацієнтів з АР, сенсibilізованих до кліщів домашнього иполу та встановити їх роль в регуляції синтезу IgE, що надалі може стати мішенню для нових підходів та оцінки ефективності лікування АР.

Пацієнти були включенні в дослідження в період з травня по грудень. Для усіх пацієнтів характерними були симптоми легкого, помірного та важкого АР. Серед обстежених пацієнтів у 45 (76%) були скарги на періодичне/постійне чхання, у 39 (65,6%) – ринорею, у 43 (73,0%) – закладеність носа, у 37 (62,2%) – свербіж носа. Загальна характеристика пацієнтів та результати лабораторних обстежень представлені в таблиці 1.

Таблиця 4.2.1.

#### Загальна характеристика пацієнтів з АР

Параметри	Контрольна група (n=20)	IgE-залежний АР (n=30)	IgE-залежний АР (n=30)
Вік	42,4 ± 10,3 28,4 (25 – 52)	38,7 ± 5,1 27,9 (24 – 59)	45,4 ± 8,6 34,1 (23 – 54)
Стать (ч/ж)	11/9	14/16	18/12

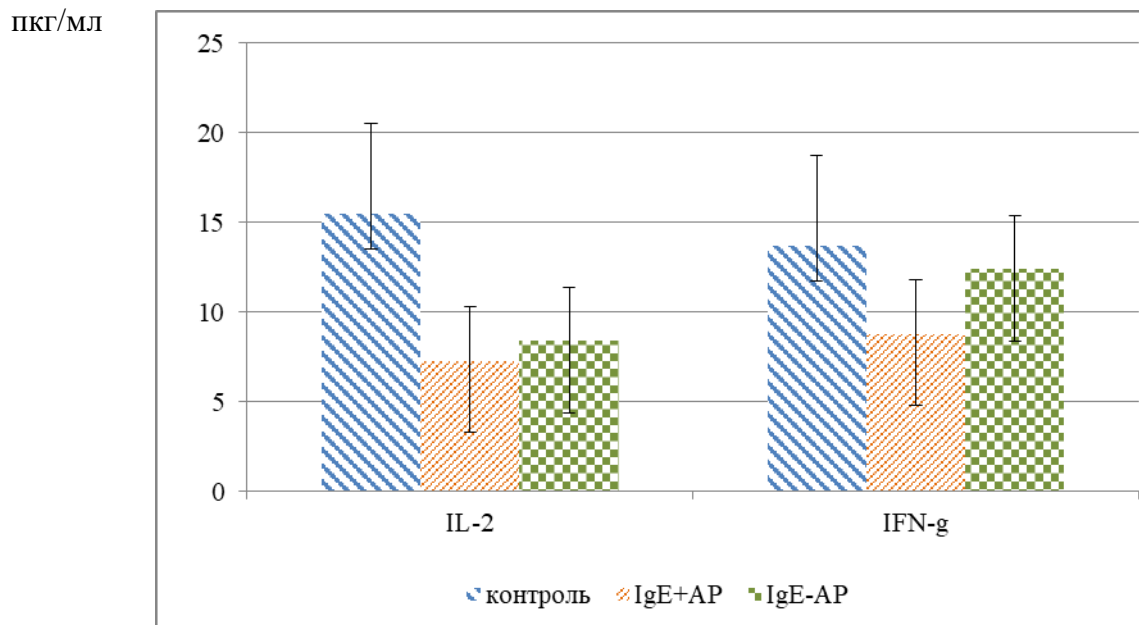
IgE, kU/L	14,5 ± 5,8 16,4 (8,8 – 20,4)	540,65 ± 124,68 294,5 (212 – 764)	72,3 ± 26,15 35,94 (45 – 98)
Еозинофіли крові абс. число, Г/л	0,15 ± 0,08 0,11 (0,07 – 0,23)	0,79 ± 0,38 0,54 (0,32 – 0,98)	0,53 ± 0,11 0,38 (0,15 – 0,64)

$M \pm m$ , SD: стандартне відхилення,  $X_{\min} - X_{\max}$ ; \*\*  $p < 0,05$ .

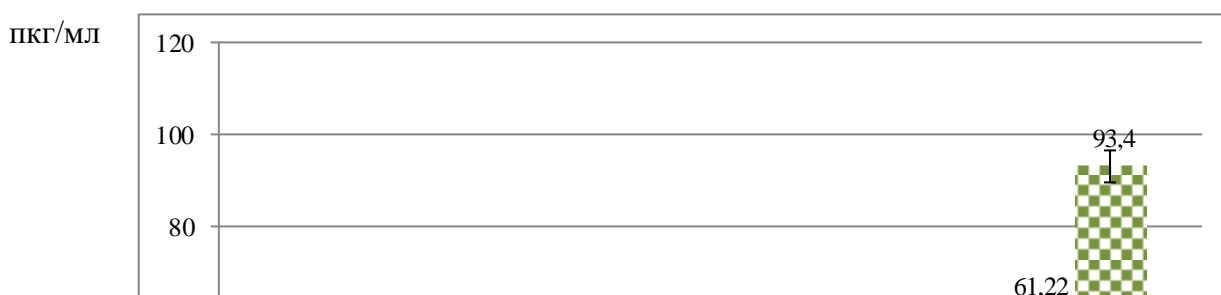
Рівень загального IgE (табл. 1), за яким пацієнти були розділені на групи, показав, що у пацієнтів I групи цей показник був значно підвищений і коливався від 212 kU/L до 764 kU/L і в середньому становив 294,5 kU/L, проти 14,5±5,8 kU/L в контрольній групі. У пацієнтів II групи рівень загального IgE коливалися в межах 45 kU/L – 98 kU/L, що в середньому становив 35,9 kU/L. При оцінці рівня еозинофілів, було встановлено вірогідно підвищення їх рівня у пацієнтів I і II групи 0,79 ± 0,38 Г/л, 0,53 ± 0,11 Г/л відповідно, що імовірно відрізнялось від показників контрольної групи 0,15± 0,08 Г/л ( $p < 0,01$ ). Однак порівнюючи числа еозинофілів між I і II групою вірогідних відмінностей його рівня виявлено не було.

На сьогодні відомо, що в розвитку АР імунорегуляторну роль відіграє баланс між Th1 і Th2 лімфоцитами. Регуляторну роль Th1 оцінювали за синтезом ІЛ-2 та  $\gamma$ -IFN. Результати проведених досліджень представлені на рис. 4.2.1. У результаті проведеного нами дослідження, було показано, що рівень ІЛ-2 був вірогідно зниженим у пацієнтів обох дослідних груп. У осіб з атопією рівень ІЛ-2 був зниженим у 2,1 раза до 7,27±13пг/мл порівняно з контрольною групою ( $p < 0,01$ ). У пацієнтів II групи також встановлено зниження рівня ІЛ-2 до 8,4±0,97 у порівнянні з контрольною групою 1 ( $p < 0,05$ ). Оцінка рівня  $\gamma$ -IFN показала вірогідне його зниження у 1,6 раза до 8,8±1,21 пг/мл лише у пацієнтів I групи порівняно з контролем ( $p < 0,05$ ). При порівнянні рівня цитокінів між I і II групами вірогідних відмінностей за рівнем цих цитокінів виявило не було.

Маркерами Th2 типу імунної відповіді слугували ІЛ-4, ІЛ-5 та ІЛ-13 (рис. 4.2.2). В результаті проведеного аналізу було показано, що рівень ІЛ-4 був вірогідно вищим контрольних значень і становив  $28,8 \pm 2,3$  пг/мл проти  $15,42 \pm 0,63$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). При чому вірогідне підвищення його рівня було характерним лише для пацієнтів І групи. Оцінка рівня ІЛ-5 показала вірогідне його підвищення у пацієнтів обох груп. Рівень ІЛ-5 у пацієнтів І групи становив  $25,6 \pm 0,65$  пг/мл, а у пацієнтів ІІ групи  $29,8 \pm 0,72$ , що було майже вдвічі вище у порівнянні з контролем ( $p < 0,01$ ). При оцінці рівня ІЛ-13 підвищення його рівня було також характерним для двох дослідних груп. Однак у пацієнтів І групи зафіксовано збільшення його синтезу майже у 3 рази до  $61,22 \pm 8,12$  пг/мл, тоді як у пацієнтів ІІ групи його рівень був майже у 5 разів вищим і становив  $93,4 \pm 3,82$  пг/мл у порівнянні з контролем ( $p < 0,001$ ). Цікавим виявився той факт, що при порівнянні рівня синтезу цитокінів між двома групами пацієнтів було встановлено вірогідне підвищення лише рівня ІЛ-13 у пацієнтів ІІ групи ( $p < 0,001$ ).

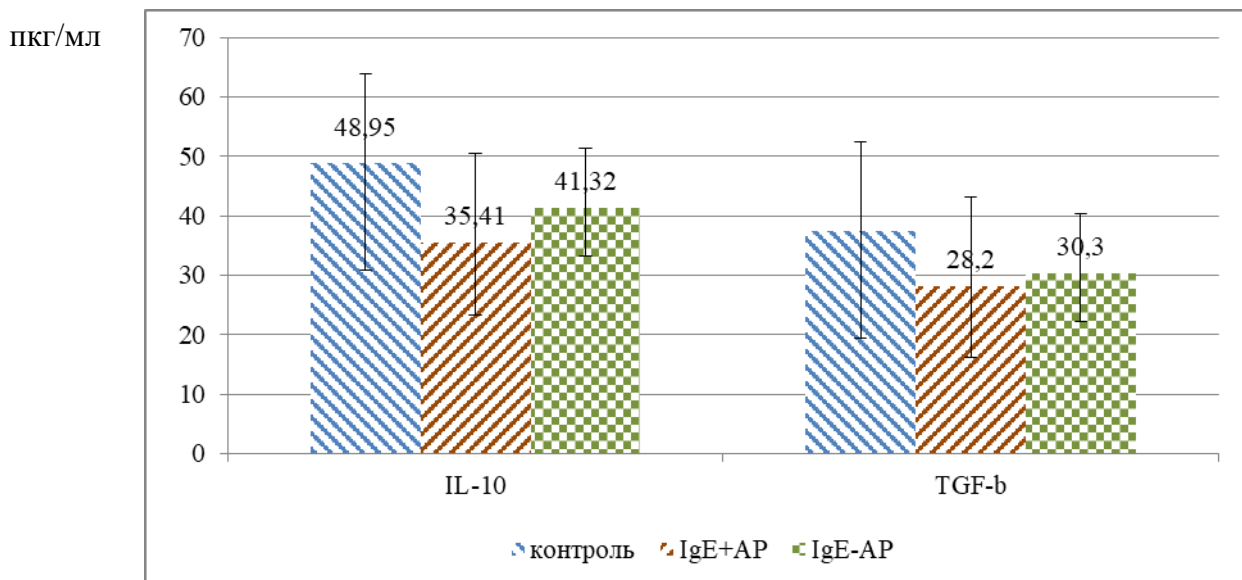


**Рис. 4.2.1** Рівень сироваткових цитокінів (пг/мл), що продукуються Т-хелперами І типу





**Рис. 4.2.2. Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами II типу**



**Рис. 4.2.3. Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-лімфоцитами регуляторними**

Іншу підгрупу Th лімфоцитів представляють регуляторні Т-лімфоцити (Treg), які здійснюють супресивний вплив на розвиток запалення

опосередкованого Th1 і Th2 лімфоцитами. Відомо, що як кількісна, так і функціональна недостатність Treg лімфоцитів викликає розвиток алергічного запалення поряд з підвищенням активності Th2 лімфоцитів. Treg контролюють алергічне запалення шляхом синтезу IL-10 і трансформуючого фактора росту- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). В результаті проведеного нами дослідження (рис. 3) було встановлено вірогідне зниження рівня IL-10 як у пацієнтів I групи, так і пацієнтів II групи у порівнянні з контролем ( $p < 0,01$ ). При чому у пацієнтів I групи ці зміни були більш вираженими. У I групі пацієнтів встановлено зниження рівня IL-10 у 1,3 раза до  $35,41 \pm 2,18$  пг/мл, а II групі до  $41,32 \pm 6,32$  пг/мл. При оцінці рівня TGF- $\beta$  було встановлено зниження його рівня лише у пацієнтів I групи. Порівнюючи ці показники між двома обстежуваними групами, було виявлено вірогідну відмінність за рівнем IL-10. У пацієнтів I групи він був нижчим у порівнянні з пацієнтами другої групи та становив  $35,41 \pm 9,18$  пг/мл проти  $41,32 \pm 6,32$  пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Попередні дослідження вказують на те, що механізм розвитку АР переважно викликаний дисбалансом між Th1 і Th2 лімфоцитами. Однак, згідно з останніми даними багатьох досліджень, механізми розвитку АР можуть протікати за різними шляхами як за участю Th клітин, так і вроджених лімфоїдних клітин. Також враховуючи здатність алергенів кліщів домашнього пилу безпосередньо активувати ефektorні клітини, цікавим було оцінити особливості синтезу цитокінів, які приймуть участь в розвитку алергії. Проведене нами дослідження показало, що для пацієнтів з IgE-залежним АР характерним було посилення відповіді Th2 лімфоцитів на алерген, який відображався у значно підвищених рівнях експресії IL-4, IL-5 і IL-13, що в подальшому призводило до розвитку еозинофілії і синтезу IgE. Для пацієнтів з IgE-незалежною формою АР характерним було підвищення рівня IL-5 та IL-13. При цьому рівень IL-13 був вірогідно вищим у порівнянні з IgE-залежною формою АР. Така направленість імунної відповіді була зумовлена дисбалансом між цитокінами, що продукуються Th1, Th2 лімфоцитами і Treg клітинами.

Зміни рівня ІЛ-2 спостерігали у двох групах, однак при порівнянні його рівня між двома дослідними групами пацієнтів вірогідних змін його рівня не виявлено. Зниження рівня  $\gamma$ -ІFN було характерним лише для пацієнтів з ІgЕ-залежним АР. Також, при проведенні дослідження було встановлено, що у пацієнтів з ІgЕ-залежним АР, на відміну від ІgЕ-незалежного АР, спостерігається вірогідне зниження показників як ІЛ-10, так і TGF- $\beta$ . Отримані результати можуть свідчити про те, що недостатність функціональної активності цих Treg клітин сприяє як поляризації імунної відповіді в бік Th2 лімфоцитів, так і посиленню синтезу цитокінів ВЛК, що в результаті призводить до розвитку алергії.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження було показано, що розвиток алергічного запалення у пацієнтів з ІgЕ-залежним та ІgЕ-незалежним АР з сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу асоціюється з дисбалансом між Th1 і Th2 лімфоцитами, а також зниженням функції Treg клітин в обох дослідних групах. Вірогідну відмінність за синтезом цитокінів було встановлено лише за рівнем ІЛ-13.

При проведенні дослідження встановили, що для пацієнтів з ІgЕ-залежною формою АР характерним було зниження рівня Th1 цитокінів ІЛ-2 і  $\gamma$ -ІFN, підвищення рівня Th2 цитокінів - ІЛ4, ІЛ5 та ІЛ13 та зниження Treg цитокінів - ІЛ-10 і TGF- $\beta$ . При цьому встановлено вірогідне зниження рівня супресивного цитокіну ІЛ-10 порівняно з групою пацієнтів з ІgЕ-незалежною формою АР. Для пацієнтів з ІgЕ-незалежною формою характерним було лише підвищення рівня ІЛ-13. Вірогідну відмінність між іншими Th1, Th2 та Treg цитокінами виявлено не було.

#### **4.3. Функціональна активність *in vitro* клітин імунної системи периферичної крові у пацієнтів на алергічний риніт, викликаний сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу**

Згідно з останніми даними розвиток алергічних реакцій спричинених кліщами домашнього пилу відбувається різними шляхами, які ведуть до активації

Th2 імунної відповіді. Однак точна природа клітинних і молекулярних взаємодій, які ініціюють, регулюють цю Th2 імунну відповідь залишається до кінця не з'ясованою. На сьогодні розглядаються різні шляхи активації імунної відповіді, які призводять до розвитку алергії, які зв'язані, та не зв'язані з продукцією IgE. Ініціювання Th2 імунної відповіді є результатом складної взаємодії декількох молекулярних шляхів, що включають адаптивний і вроджений імунітет. Однак повне з'ясування молекулярних взаємодій, які керують Th2 відповіддю, можливе при більш повному розумінні ролі цитокінів у цих процесах [10].

Виходячи із вище сказаного цікавим було б оцінити активність цитокінової продукції у пацієнтів з різними формами АР сенсibilізованих до кліщів домашнього пилу в умовах *in vitro* для з'ясування можливих патогенетичних відмінностей у цих групах хворих. Необхідно відзначити, що комплексних досліджень функціональної активності імунокомпетентних клітин периферичної крові у хворих АР за їхньою здатністю продукувати різні цитокіни *in vitro* у доступній літературі виявилось не достатньо. Також відсутні дані про дослідження особливостей функціональної активності *in vitro* клітин імунної системи при IgE-залежній і IgE-незалежній формі АР.

У зв'язку з цим метою нашого дослідження було оцінити цитокін-продукуючу активність мононуклеарних клітин периферичної крові пацієнтів з АР сенсibilізованих до кліщів домашнього пилу для з'ясування додаткових диференційних критеріїв, що дозволять розмежувати IgE-залежну і IgE-незалежну форму захворювання, що надалі може стати основою для нових підходів щодо лікування та оцінки ефективності лікування АР.

Нами були проведені *in vitro* дослідження стану імунітету у хворих з різними клінічними формами АР з вивченням функціональної активності клітин Т-хелперів I типу - за продукцією IL-2 і IFN- $\gamma$ ; Т-хелперів II типу - за продукцією IL-4, IL-5, IL-13; а також Treg-лімфоцитів периферичної крові пацієнтів за їх здатністю продукувати IL-10 і TGF- $\beta$ .

IL-2 є найважливішим ростовим фактором для різних популяцій лімфоїдних клітин. Основна біологічна роль IL-2 полягає в індукції проліферації Т-клітин, дозріванні цитотоксичних Т-клітин, диференціації В-лімфоцитів. Під впливом цього цитокіну відбувається активація функції НК-клітин і макрофагів. IL-2 разом з IFN- $\gamma$  регулює у В-лімфоцитах експресію генів, відповідальних за синтез імуноглобулінів. Крім того, IL-2 відіграє важливу роль в патогенезі АР за рахунок активації Т-регуляторних лімфоцитів. Високоафінні рецептори Т-регуляторних клітин - швидко зв'язує IL-2R, що призводить до його дефіциту і унеможлиблює його використання іншими клітинами, і як наслідок зниження їх проліферації та диференціації. Підвищення рівнів IL-2 посилює активацію Treg клітин [13, 78].

Дані щодо спонтанної та мітогенактивованої продукції цитокінів Th1-лімфоцитами в супернатантах клітин крові, отриманих у здорових осіб, хворих IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР представлені в таблиці.4.3.1.

В контрольній групі спонтанна продукція IL-2 у середньому становила  $25,8 \pm 1,3$  пг/мл. Активація мононуклеарів, виділених із крові здорових донорів мітогеном, приводила до підвищення індукованої продукції IL-2, рівень якого в середньому становив  $43,8 \pm 2,6$  пг/мл.

При оцінці рівня IL-2 у хворих IgE-залежною формою АР було встановлено зниження його рівня до  $18,8 \pm 1,5$  пг/мл у порівнянні з контрольною групою  $25,8 \pm 1,3$  пг/мл ( $p < 0,05$ ), тоді як у групі хворих з IgE-незалежною формою АР практично не відрізнявся від норми і становив  $23,5 \pm 1,6$  пг/мл.

При активації клітин крові мітогеном, було встановлено підвищення синтезу IL-2 клітинами. Однак, порівнюючи отримані дані між різними групами хворих було встановлено, що рівень IL-2 у групі хворих з IgE-залежною формою АР був вірогідно нижчий у порівнянні з показниками контрольної групи і становив  $23,7 \pm 0,9$  пг/мл, проти  $43,8 \pm 2,6$  пг/мл у контролі ( $p < 0,05$ ). Оцінка рівня IL-2 у групі хворих з IgE-незалежною формою АР показала також зниження його рівня до

38,6±1,2пг/мл, однак він був вищим порівняно з показниками у групі з IgE-залежною формою АР (p<0,05) .

IFN-γ продукується Th1 лімфоцитами, володіє широким спектром фізіологічних функцій та є ключовим цитокиновим в регуляції роботи вродженої і набутої ланок імунної системи. Важливою є регуляторна функція IFN-γ у диференціації “наївних” Th-лімфоцитів у Th1 лімфоцити, а також продукція останніми під впливом IFN-γ цитокінів Th1 профілю. В той самий час, відзначена й інша регуляторна дія даного цитокіну. Як виявилось, IFN-γ здатний пригнічувати проліферацію Th2 лімфоцитів і синтез Th2 типу цитокінів, таких як IL-4, IL-5 і IL-13, а також знижує продукцію IgE [18]. Існує багато публікацій, які стверджують про важливу роль IFN-γ у розвитку алергічних захворювань. Так, високі рівні IFN-γ в сироватці корелюють зі зменшенням в крові кількості еозинофілів і загального рівня IgE [32]. Поліморфізм гена IFN-γ підвищує сприйнятливість до астми у дітей [60].

У зв'язку з тим, що роль IFN-γ у становленні алергічного запалення у хворих АР до кінця не з'ясована, нами було проведено дослідження щодо вивчення спонтанної і індукованої продукції IFN-γ мононуклеарними клітинами периферичної крові з метою диференціальної діагностики IgE-залежної і IgE-незалежної форм АР, викликаного сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу.

Таблиця 4.3.1.

**Продукція IL-2 та IFN-γ мононуклеарними клітинами крові в умовах  
*in vitro***

Форма АР	IL-2 (пг/мл)		IFN-γ (пг/мл)	
	Спонтанна продукція	Індукована продукція	Спонтанна продукція	Індукована продукція
<b>Контрольна група (n=30)</b>	25,8±1,3	43,8±2,6	16,4±0,6	46,5±3,5

<b>IgE-залежна</b> <b>(n=32)</b>	18,8±1,5	23,7±0,9*	10,4±0,8*	29,5±2,5*
<b>IgE-незалежна</b> <b>(n=30)</b>	23,5±1,6	38,6±1,2**	17,4±2,1**	34,5±4,2*

\*-вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )

\*\* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

Оцінка рівня IFN- $\gamma$  показала, що спонтанна продукція мононуклеарами IFN- $\gamma$  у здорових осіб в середньому становить 16,4±0,6 пг/мл. При активації клітин мітогеном вміст IFN- $\gamma$  у супернатантах підвищувався до рівня 46,5±3,5 пг/мл.

Як видно з табл. 4.31, рівень спонтанної та індукованої продукції клітинами IFN- $\gamma$  у хворих IgE-залежною формою АР був вірогідно нижче і становив 10,4±0,8 пг/мл, 29,5±2,5 пг/мл відповідно у порівнянні з показниками контрольної групи ( $p < 0,05$ ). Групі хворих із IgE-незалежною формою АР рівень спонтанної продукції IFN- $\gamma$  практично не відрізнявся від норми, однак був знижений при активації мітогеном і становив 34,5±4,2 пг/мл.

IL-4 - це ключовий цитокін, який бере участь в патогенезі алергічних захворювань. IL-4 продукується Th2-лімфоцитами, огрядними клітинами і базофілами. Продукція IL-4 індукує синтез IgE, експресію головних молекул комплексу гістосумісності типу II та поверхневого IgM на В-лімфоцитах, тим самим підвищуючи їх антигенпрезентуючу здатність. Підвищений рівень продукції IL-4 Th2 -лімфоцитами в легенях викликає еозинофільні запалення, що призводить до стимуляції клітин, які продукують слиз. Незважаючи на велику кількість публікацій про роль IL-4 у патогенезі АР, як і раніше, викликає інтерес з'ясування здатності мононуклеарних клітин до продукції IL-4 цитокіну у хворих у гострому і хронічному періоді при IgE-залежній і IgE-незалежній формі захворювання [53, 133].

Дані щодо продукції IL-4 у супернатантах клітин крові до і після їх стимуляції мітогеном у групах хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою

АР представлені в таблиці 4.3.2. Згідно з отриманими даними було встановлено, що в нормі спонтанна продукція ІЛ-4 у середньому становила  $35,7 \pm 6,5$  пг/мл. Активація мононуклеарів здорових донорів мітогеном призводила до підвищення індукованої продукції ІЛ-4 у 2 рази і становила  $75,4 \pm 5,8$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). При оцінці спонтанної продукції ІЛ-4 у супернатантах клітин крові у групах хворих з ІgЕ-залежною формою АР було встановлено, що його рівень був вищим у 2 рази і становив  $69,4 \pm 7,2$  пг/мл, тоді як мітогенактивована продукція ІЛ-4 показала підвищення рівня його продукції до  $125,6 \pm 13,3$  пг/мл. Вищими ці показники були і у відношенні до показників ІЛ-4 у групі хворих з ІgЕ-незалежною формою АР, де його рівень становив  $48,4 \pm 6,5$  пг/мл і  $98,6 \pm 7,3$  пг/мл відповідно ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, отримані результати вказують на те, що при ІgЕ-залежній формі АР потенціал клітин щодо синтезу ІЛ-4 є значно вищим, що і призводить до активації Th2 –лімфоцитів та синтезу ІgЕ.

ІЛ-5 продукується Th2-лімфоцитами. Його функція полягає у індукції диференціації, активації і хемотаксису еозинофілів, а також проліферації і диференціації В-лімфоцитів. ІЛ-5 бере участь в посиленні синтезу ІgЕ та рецепторів до нього на поверхні еозинофілів, базофілів і В-лімфоцитів. Крім стимуляції проліферації клітин, ІЛ-5 значно підсилює продукцію імуноглобулінів В-лімфоцитами, активованими специфічним алергеном.

З огляду на провідну роль еозинофілів у формуванні алергічного запалення, і особливий вплив ІЛ-5 на функціональну активність цих клітин, нами проведені дослідження спонтанної і індукованої продукції ІЛ-5 мононуклеарними клітинами крові у хворих з ІgЕ-залежною і ІgЕ- незалежною формами АР.

Таблиця 4.3.2.

**Продукція ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13 мононуклеарними клітинами крові в умовах  
*in vitro***

Форма АР	ІЛ-4 (пг/мл)	ІЛ-5 (пг/мл)	ІЛ-13 (пг/мл)
----------	-----------------	-----------------	------------------



	Спонт. продукція	Індуков. продукція	Спонт. продукція	Індуков. продукція	Спонт. продукція	Індуков. продукція
<b>Контроль на група (n=30)</b>	35,7±6,5	75,4±5,8	26,8±2,2	65,8±6,3	40,7±2,9	91,6±3,8
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	69,4±7,2 *	125,6±13,3*	78,3±8,4*	205,5*±15,4	80,3±16,1*	142,7±12,8*
<b>IgE-незалежна (n=30)</b>	48,4±6,5	98,6±7,3 *,**	32,4±1,9* *	139,3±14,4 *,**	68,8±5,4 *,**	184,4±13,1 *,**

\*-вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )

\*\*-вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

При оцінці рівня продукції ІЛ-5 у супернатантах клітин було визначено, що в групі здорових осіб спонтанний рівень його продукції становив  $26,8 \pm 2,2$  пг/мл, а стимуляція міогеном призводила до підвищення його рівня до  $65,8 \pm 6,3$  пг/мл. У групі хворих з IgE-залежною формою АР спостерігали підвищення як спонтанної продукції ІЛ-5 у 3 рази до  $78,3 \pm 8,4$  пг/мл, так і стимульованої міогеном до  $205,5 \pm 15,4$  пг/мл у порівнянні з контрольною групою ( $p < 0,05$ ). У групі хворих з IgE-незалежною формою АР також спостерігали підвищення продукції ІЛ-5, однак його рівень був нижчим у порівнянні з групою хворих з IgE-залежною формою АР, при цьому рівень спонтанної продукції практично не відрізнявся від показників контрольної групи, а стимуляція міогеном призводила до збільшення його синтезу до  $139,3 \pm 14,4$  пг/мл.

Таким чином, у групі хворих IgE-залежною формою АР на відміну від IgE-незалежної форми спостерігається високий рівень індукованої продукції *in vitro* мононуклеарами ІЛ-5, що також свідчить про підвищену функціональну активність Th2 клітин.

Функціональні і структурні характеристики ІЛ-13 схожі з характеристиками ІЛ-4. Їх рецептори (ІЛ-4R $\alpha$ /ІЛ-13R $\alpha$ 1) присутні на активованих

В- і Т-клітинах, макрофагах, опастистих клітинах, фібробластах, епітеліальних клітинах, м'язових клітинах і гематопоетичних клітинах-попередниках. Передача сигналів ІЛ-13 впливає на баланс Th1/Th2 через шлях STAT6 та бере участь в розвитку астми. Високі рівні ІЛ-13 секретуються Th2 клітинами у пацієнтів з астмою, ІЛ-13 індукує інфільтрацію еозинофілів, гіперплазію келихоподібних клітин, секрецію слизу, скоротливу здатність клітин гладких м'язів дихальних шляхів і синтез ІgЕ В-клітинами. Рівні ІЛ-13 зафіксовані у хворих на астму, які підтверджують позитивну кореляцію між важкою астмою і високими рівнями ІgЕ [115].

Враховуючи, що роль ІЛ-13 у хворих АР до кінця не з'ясована, нами було проведене дослідження щодо вивчення спонтанної та індукованої продукції ІЛ-13 мононуклеарними клітинами периферичної крові у хворих з ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формами захворювання АР викликаного сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу.

Оцінка продукції ІЛ-13 в умовах *in vitro* показала, що в групі здорових осіб його рівень становив  $40,7 \pm 2,9$  пг/мл, а стимуляція мітогеном призводила до підвищення його рівня ІЛ-13 до  $91,6 \pm 3,8$  пг/мл. В групі хворих з ІgЕ-залежною формою АР спостерігали підвищення рівня до  $80,3 \pm 16,1$  пг/мл і  $142,7 \pm 12,8$  відповідно, у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ). Цікавим виявився той факт, що у групі хворих з ІgЕ-незалежною формою АР рівень спонтанної продукції ІЛ-13 був нижчим і становив  $68,8 \pm 5,4$  пг/мл, проте рівень мітогенактивованої продукції був вищим і становив  $184,4 \pm 13,1$  пг/мл у порівнянні з групою хворих з ІgЕ-залежною формою АР ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, згідно з проведеними нами досліджень встановлено, що ІgЕ-залежна форма на відміну від ІgЕ-незалежної форми АР захворювання характеризується підвищенням *in vitro* рівня індукованої продукції ІЛ-13.

Як відомо, в розвитку АР вагому роль відіграє і інша підгрупа Тh-клітин, а саме підгрупа регуляторних Т-клітин, які здійснюють супресивний вплив на розвиток алергічного запалення шляхом синтезу ІЛ-10 і трансформуючого

фактора росту- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [135]. Багато досліджень вказують саме на те, що серед хворих, які страждають на алергічні хвороби, виявлено порушення у функціональній активності Treg клітин, яке сприяє поляризації Th2 і, відповідно, синтезу IgE [127].

У зв'язку із цим, нами було проведене дослідження *in vitro* продукції ключових цитокінів Th3 профілю (TGF- $\beta$  і IL-10) мононуклеарними клітинами периферичної крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР із сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу.

IL-10 є важливим регуляторним цитокіном, який пригнічує активацію Т-клітин, за рахунок інгібування продукції IL-12 та зниження експресії молекул МНС класу II дендритними клітинами і макрофагами. IL-10 стимулює IFN- $\gamma$ , який відіграє важливу роль у вроджених і адаптивних імунних реакціях, а також стимулює В-лімфоцити до синтезу імуноглобулінів [135].

Результати досліджень спонтанної та індукованої продукції мононуклеарними клітинами крові IL-10 у здорових і хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АР представлені в табл. 4.3.3.

Як показано в табл. 4.3.3 у контрольній групі спонтанна продукція IL-10 у середньому склала  $116,9 \pm 11,2$  пг/мл. Активація міогеном мононуклеарів, виділених із крові здорових донорів міогеном, призводила до підвищення індукованої продукції IL-10, рівень якого в середньому становив  $558,7 \pm 15,6$  пг/мл.

Таблиця 4.3.3

**Продукція IL-10 та TGF- $\beta$  мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro***

Форма АР	IL-10 (пг/мл)		TGF- $\beta$ (пг/мл)	
	Спонтанна продукція	Індукована продукція	Спонтанна продукція	Індукована продукція
<b>Контрольна</b>				

<b>група (n=30)</b>	116,9±11,2	558,7±15,6	79,53±3,2	105,6±13,5
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	98,5±8,4	589,4±12,5*	63,3±1,4*	86,1±11,7
<b>IgE-незалежна (n=30)</b>	108,8±8,3	535,4±14,6	174,6±11,6**	218,6±15,2

\*-вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб (p<0,05)

\*\* -вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР (p<0,05)

Рівень спонтанної продукції ІЛ-10 у групах хворих з ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формами АР був зниженим у порівнянні з контрольною групою (p<0,05). При порівнянні результатів рівня індукованої продукції ІЛ-10 у цих двох групах хворих було показано, що його рівень практично не відрізнявся і становив 589,4±12,5 пг/мл, 535,4±14,6 пг/мл відповідно.

Таким чином, у даних групах хворих на АР не спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції *in vitro* мононуклеарними клітинами ІЛ-10, що пов'язано із пригніченням функції Тreg лімфоцитів.

Деякі дослідники відзначають, що в умовах хронічного алергічного запалення виявляються Т-клітини, для яких характерна відносно висока продукція ТGF-β. ТGF-β представляє собою цитокін, який продукується багатьма клітинами, такими як еозинофіли, нейтрофіли, опасисті клітини, ендотеліальні клітини, гладком'язові клітини дихальних шляхів та фібробласти. Однак низка дослідників схиляються до думки, що вагома роль в синтезі ТGF-β належить саме Тreg клітинам, для яких характерні ці властивості. Можливо, саме активація цих клітин, які продукують ТGF-β, викликає перемикання патологічного процесу з Th2 на Th1 тип імунної відповіді.

Щодо особливостей синтезу ТGF-β, то було показано (табл.4.3.3), що спонтанна продукція ТGF-β у середньому склала 79,53±3,2 пг/мл. Активація *in vitro* мононуклеарів, виділених із крові здорових донорів мітогеном, приводила до

підвищення індукованої продукції TGF- $\beta$ , рівень якої в середньому становив  $105,6 \pm 13,5$  пг/мл. При дослідженні *in vitro* продукції TGF- $\beta$  мононуклеарними клітинами хворих IgE-залежною формою АР був виявлений вірогідно низький рівень як спонтанної  $63,3 \pm 1,4$  пг/мл, так і і стимульованої  $86,1 \pm 11,7$  пг/мл продукції TGF- $\beta$  у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ). Проте, при оцінці відповідних результатів у групі хворих з IgE-незалежною формою АР були відмічені вірогідно підвищені рівні як спонтанної, так і індукованої продукції TGF- $\beta$  майже у 2 рази до  $174,6 \pm 11,6$  пг/мл та  $218,6 \pm 15,2$  пг/мл відповідно, у порівнянні з контролем ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, у хворих IgE-залежною формою АР, на відміну від IgE-незалежної, спостерігалось достовірне зниження показників спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro*, тоді як у хворих з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищенням рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

Важливість цитокінів Th2 лімфоцитів у розвитку алергічної сенсibiliзації і патології алергічного запалення добре відома [127, 135]. У той час як у здорових людей переважають клітини Th1-типу, в слизовій оболонці носа і епітеліальних тканинах суб'єктів з АР переважають лімфоцити типу Th2 [124]. Імунологічна роль в розвитку АР належить порушенню балансу між Th1 і Th2 клітинами. У пацієнтів з атопією активація Th2 лімфоцитів призводить до продукції цитокінів, таких як IL-4, IL-13, стимуляції В-лімфоцитів і продукції IgE.

В результаті проведеного нами дослідження встановлено, що у групі хворих з IgE залежною формою АР спостерігається зниження продукції цитокінів, які продукуються Th1 лімфоцитами, а саме IL-2, IFN- $\gamma$ , посилення продукції цитокінів, які продукуються Th2 лімфоцитами такі як IL-4, IL-5, IL-13. Порушення дисбалансу між Th1/Th2 лімфоцитами супроводжувалось зниженням продукції супресивних цитокінів IL-10 і TGF- $\beta$ . Таким чином, у групах хворих з IgE-залежною формою АР спостерігається посилення спонтанної та індукованої

продукції цитокінів *in vitro* клітинами що посилює розвиток алергічного запалення та посилення синтезу IgE [124].

У групі хворих з IgE-незалежною формою АР, на відміну від IgE-залежної, спостерігався дисбаланс синтезу цитокінів Th1 і Th2 лімфоцитів. Однак вірогідних змін рівня IFN- $\gamma$  встановлено не було. Спостерігалась ця тенденція до зміни рівня Th2 цитокінів, однак значення показників їх рівня були дещо нижчими. Цікавим виявилось те, що у групі хворих з IgE-незалежною формою спостерігали достовірне зниження показників спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro*, тоді як у хворих з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищенням рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

Отже, цитокіни відіграють центральну роль в патогенезі алергічних захворювань. Розуміння механізмів, які регулюють синтез і функцію цитокінів є досить важливим, що може бути основою розвитку більш ефективних методів лікування.

Результати дослідження представлені у наступних публікаціях:

Оцінка цитокінового профілю у пацієнтів на алергічний риніт викликаний сенсibiliзацією до кліщів домашнього та пилу» Імунологія та алергологія: наука і практика.-2020.- Юр`єв С.Д.

## РОЗДІЛ 5

### **5.1.ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ АЛЕРГЕНІМУНОТЕРАПІЇ У ПАЦІЄНТІВ З СЕНСИБІЛІЗАЦІЄЮ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬОГО ПИЛУ ТА IgE ЗАЛЕЖНОЮ І IgE-НЕЗАЛЕЖНОЮ ФОРМОЮ АЛЕРГІЧНОГО РИНИТУ**

#### **5.1.1. Оцінка клінічної ефективності алерген специфічної імунотерапії у пацієнтів з сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу**

На сьогодні алергію можна сміливо назвати хворобою XXI століття. З кожним роком збільшується кількість пацієнтів, які звертаються зі скаргами, пов'язаними з різними видами алергопатології [1, 23]. Прояви алергічних хвороб різноманітні, а відтепер різними є варіанти терапії гострих алергічних станів і хронічних алергічних захворювань. Важливо, що симптоматична фармакотерапія у більшості випадків лише тимчасово купує алергосимптоматику, а в низки пацієнтів після тривалого використання певних препаратів формується резистентність. Натомість, єдиним патогенетично обумовленим методом лікування алергічних захворювань, що був визнаний Всесвітньою організацією охорони здоров'я - є АСІТ. АСІТ полягає у багаторазовому введенні сенсibiliзованим особам причинно-значущих алергенів у субпорогових дозах, що призводить до активації імунотулюючих механізмів і забезпечення стійкої ремісії симптомів під час подальшого впливу природних алергенів [2, 3, 4, 7].

На сьогодні АСІТ добре себе зарекомендувала при лікуванні АР, БА, АД, інсектної алергії тощо [2, 4, 26, 64].

Традиційно АСІТ проводять у вигляді субкутанних ін'єкцій (СКІТ). Сублінгвальний підхід (СЛІТ) як альтернатива, на сьогоднішній день набув значного інтересу і також широко використовується, особливо у дитячій популяції [24, 88]. Ефективність АСІТ залежить від якості алерговакцини, однак темою багатьох дискусій залишаються питання досконалості методик введення препарату, їх клінічної ефективності, безпеки в плані побічних реакцій [12 64].

На момент консультативного обстеження пацієнти звернулися з наступними скаргами (n=207): у 102 (49,3%) хворих - періодичне чихання, у 92 (44,4%) - ринорея, у 140 (67,6%) – закладеність носа, у 102 (49,3%) – свербіж, у 73 (35,3%) – ринокон'юнктивіт, у 37 (17,9%) - сухість шкірних покривів, у 19 (9,2%) – еритематозно-сквамозні висипання на шкірі верхніх кінцівок, верхньої частини грудної клітки, шиї та інших частин тіла зі свербіжем, у 51 (24,6%) – кашель різного характеру, у 27 (13,0%) - утруднене дихання.

У загальному аналізі крові у 39 (18,8%) осіб виявлена еозинофілія легкого ступеня (від 0,6 до 1,5 Г/л). У мазку-відбитку слизової порожнини носа у 104 (50,2%) осіб виявлена збільшена кількість еозинофілів (від 17,0% до 65,0% у полі зору). На підставі суб'єктивних та об'єктивних показників, результатів лабораторних і специфічних алергологічних досліджень, за критеріями позиційних документів у пацієнтів були верифіковані різні типи алергічних хвороб і запропоновано АСІТ.

АР інтермітуючий/персистуючий 120 осіб (72,4%), БА інтермітуюча або легка персистуюча 17 осіб (10,3%), АД дорослого типу 10 осіб (6,9%), коморбідна алергопатологія 18 осіб (11,4%).

Усім пацієнтам проведені ШПТ з екстрактами суміші різних груп респіраторних алергенів. За результатами ШПТ виявлено: у 102 хворих (49,3%) була сенсibilізація алергенами кліщів домашньої пилу (КДП), у 82 (39,6%) – до екстракту трав, у 55 (26,6%) – до алергенів весняних дерев, у 14 (6,8%) – суміші бур'янів, у 15 (7,2%) – домашніх тварин (кіт, собака), у семи (3,4%) – цвілевих грибків (*A. Alternata*). Причому, у 134 (64,7%) пацієнтів виявлена полісенсibilізація.

Подальші наші дослідження ефективності АСІТ проводили у пацієнтів із АР та сенсibilізацію до КДП. Метою нашої роботи було проаналізувати клінічну ефективність АСІТ з пацієнтів з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АР.

Згідно Консенсусу з молекулярної алергодіагностики (A WAO-ARIA-GA<sup>2</sup>LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics, 2013),



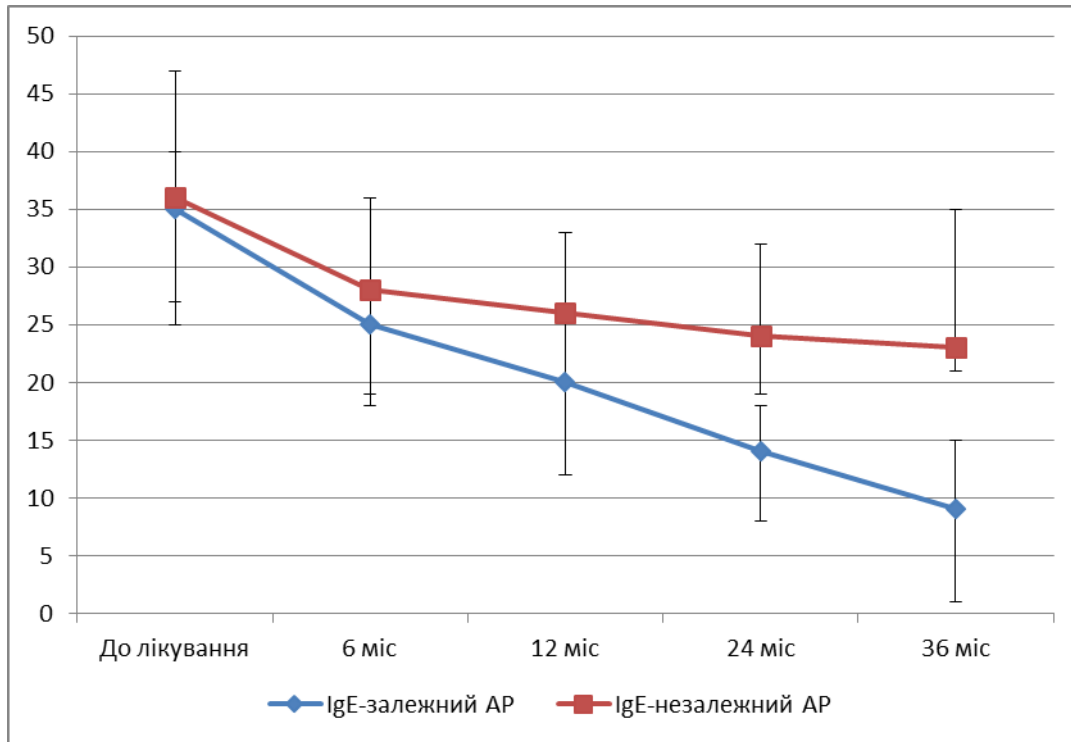
відповідно до отриманих, на перших етапах досліджень, анамнестичних, клінічних даних, які вказували на наявність у всіх пацієнтів алергопатології і підтверджувались позитивними ШПТ до респіраторних алергенів, пацієнтам (особливо з полісенсibiliзацією) було запропоновано виконати молекулярні дослідження [10]. У подальшому молекулярне дослідження виконали пацієнти, з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АР, які вирішили приймати АСІТ (n=60).

На підставі аналізу молекулярних досліджень за допомогою ALEX у пацієнтів була підтверджена сенсibiliзація до мажорних респіраторних алергенів Der p1, Der p2, Der f1, Der f2, в деяких осіб також виявлена сенсibiliзація до компонентів Der p5, Der p7, Der p11, Der p23 (12,4%) та в 4 осіб (6,6%) - до мінорного компоненту КДП Der p 10.

АСІТ призначали пацієнтам з наявністю головних компонентів (висока ефективність) або головних і мінорних компонентів (середня ефективність) [10]. Зауважимо, що серед цих пацієнтів не було осіб лише з мінорними компонентами і, відповідно, прогностично низькою ефективністю АСІТ.

Пацієнти на АСІТ (при необхідності) отримували відповідну протоколам симптоматичну і базисну терапію.

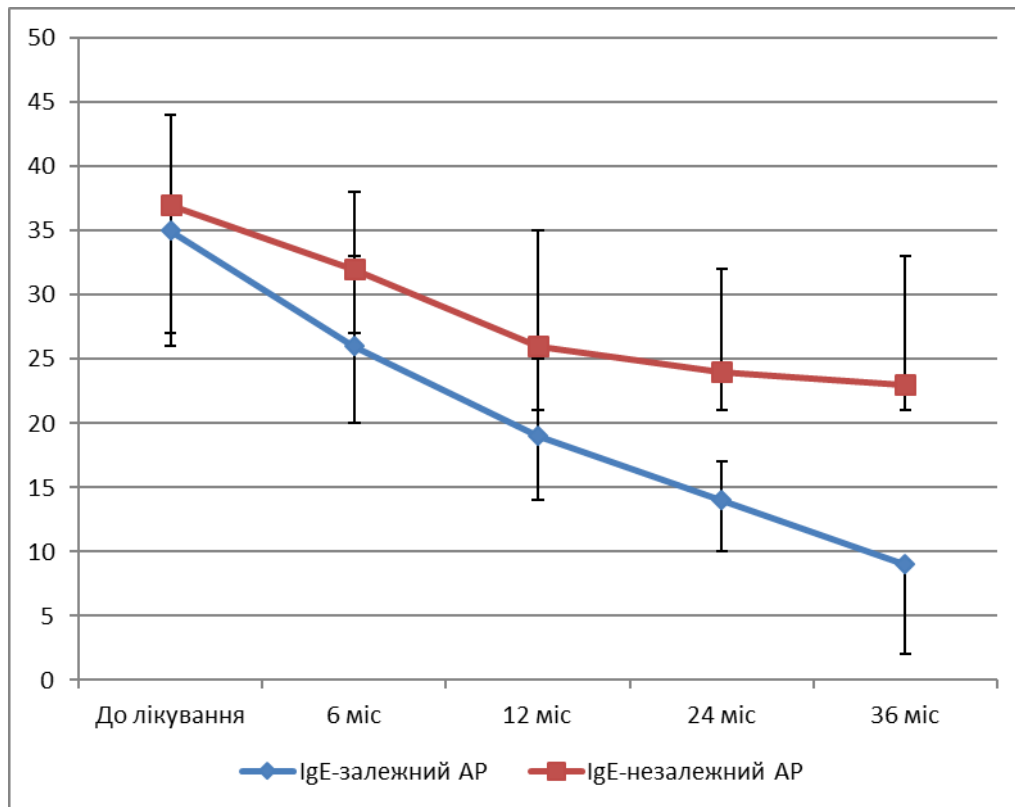
Ефективність терапії визначалася за допомогою оцінки клінічних симптомів із використання шкали ВАШ. Зокрема, у пацієнтів з IgE-залежною формою АР при аналізі верхніх носових симптомів нами відзначалося достовірне зниження оцінки за ВАШ з 35,7 мм (25;47) ,на початку лікування, до 9,0 мм (7,0;15,0) через 36 місяців терапії (p=0,0003). Тоді як у пацієнтів з IgE-незалежною формою оцінка ВАШ після лікування була вищою і становила: 36,2 мм (24,0;40,2) до початку лікування проти 23,0 мм (23,0;35,0) через 36 місяців терапії, p=0,0002 (рис. 5.1.1).



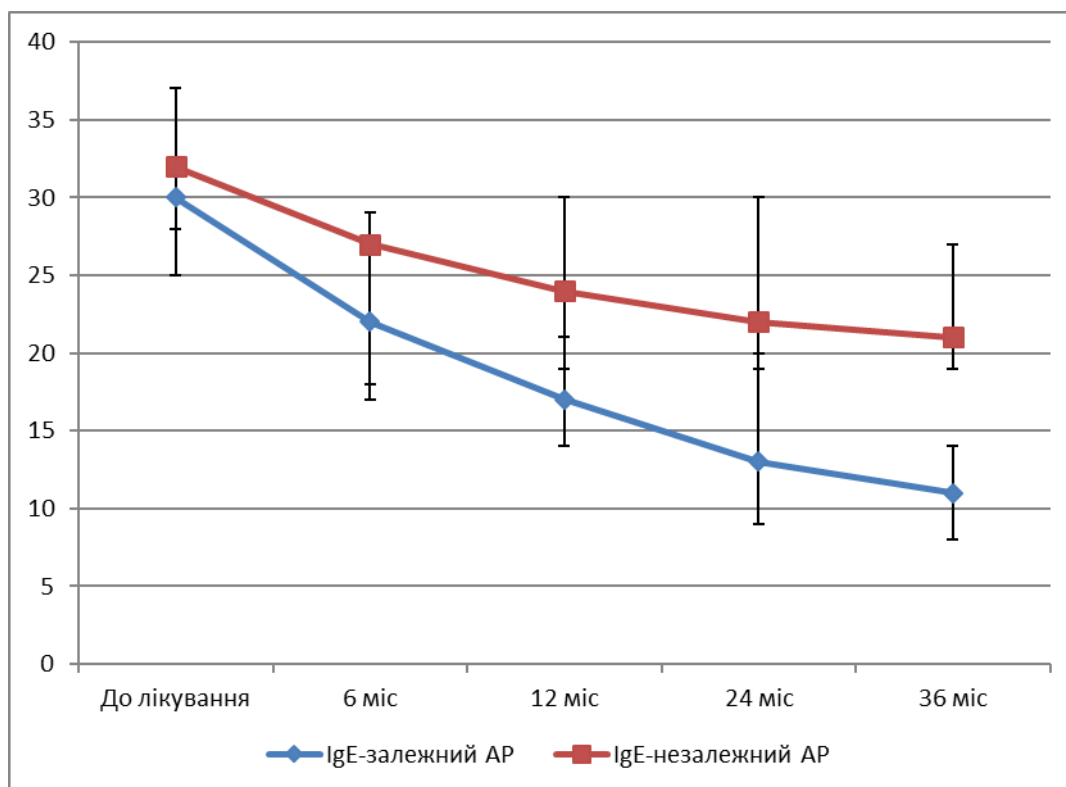
**Рис. 5.1.1.** Результати оцінки верхніх носових симптомів за шкалою ВАШ у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, які отримували СЛІТ до і після лікування (n=60)

Що стосується верхніх неносових симптомів, у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, ми також виявили достовірне їх зниження на 36 тижні спостереження порівняно з вихідним рівнем: з 35,0 мм (27,0;44,0) до 11,0 мм (8,0;14,0),  $p=0,0003$  тоді як у групі з IgE незалежною формою АР з 37,0 мм (26,0;45,0) до 25,0 мм (26,0;35,0),  $p=0,0004$ , відповідно (рис.5.1.2).

При аналізі оцінок нижніх симптомів за ВАШ у пацієнтів IgE-залежною формою АР також характеризувалося достовірним зниженням даної алергосиптоматики: з 30,5 мм (29,5;51,5) до 10,5 мм (7,5;12,5),  $p=0,0001$ . Тоді як у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР з 33,0 мм (26,0;38,0) до 21,0 мм (18;29,0),  $p=0,0001$ , відповідно (рис 5.1.3.).



**Рис. 5.1.2.** Результати оцінки верхніх неносових симптомів за шкалою ВАШ у пацієнтів, у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, (n=60)



**Рис. 5.1.3** Результати оцінки нижніх симптомів за шкалою ВАШ у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, СЛІТ (n=60)

Загалом, при аналізі оцінки симптомів за шкалою ВАШ у групі з IgE залежною формою АР ми не спостерігали достовірної різниці щодо оцінки верхніх носових симптомів при проведенні АСІТ на 6 місяці лікування (25,4 мм (17,5;38,0) проти 35,7 мм (24,8;46,7) у осіб з IgE залежною формою АР, (p=0,091). Водночас, починаючи з 12 місяця лікування оцінка верхніх носових симптомів становила 19,7 мм (12,0;26,0) проти 26,2 мм (20,7;33,3), p=0,021), а на 24 місяці 14,0 мм (8,0;18,0) проти 23,0 мм (19,0;32,4), p=0,009) та на 36 місяці спостереження 9,0 мм (7,0;15,0) проти 23,0 мм (22,9;34,7), p=0,001) статистична різниця щодо оцінки за шкалою ВАШ між групами дослідження виявлялась достовірною.

Таким чином, при оцінці верхніх носових симптомів за шкалою ВАШ достовірна різниця оцінки верхніх носових симптомів у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, при проведенні СЛІТ, спостерігалася починаючи з 12-го місяця лікування (p<0,05).

При оцінці верхніх неносових симптомів при проведенні АСІТ у групах пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР вірогідна різниця за оцінкою клінічних симптомів спостерігалась через 24 місяці (14,0 мм (10,0;17,0) проти 26,0 мм (20,0;29), p=0,009) та на 36 місяці спостереження (10,5 мм (7,5;12,5) проти 21,0 мм (11,0;29,0), p=0,001).

Таким чином, при оцінці верхніх неносових симптомів за шкалою ВАШ достовірна різниця оцінки верхніх носових симптомів у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, при проведенні СЛІТ, спостерігалася починаючи з 24 місяця лікування (p<0,05). Зниження клінічних симптомів спостерігали у двох групах, однак у групі з IgE-незалежною формою АР, оцінка неносових симптомів за шкалою ВАШ була вищою.

Оцінка нижніх симптомів за ВАШ показала вірогідну різницю показників між двома досліджуваними групами лише через 12 місяців після лікування. Оцінка верхніх носових симптомів становила 17,0 мм (13,5;21,0) проти 24,0 мм (18,5;30,0),  $p=0,021$ ), а на 24 місяці (13,0 мм (9,0;15,5) проти 25,5 мм (20,0;29,0),  $p=0,009$ ) та на 36 місяці спостереження (10,5 мм (7,5;12,5) проти 21,5 мм (10,5;28,0),  $p=0,001$ ) статистична різниця щодо оцінки за шкалою ВАШ між групами дослідження виявлялась достовірною.

Таким чином, при оцінці нижніх носових симптомів за шкалою ВАШ, достовірна різниця оцінки верхніх носових симптомів, у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР, при проведенні СЛІТ, спостерігалася починаючи з 12 місяців після лікування ( $p<0,05$ ). Оцінка нижніх носових симптомів також показала їх зниження після проведеного лікування, але у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР ці показники також були вищими у порів'янні з пацієнтами з IgE-залежною формою АР. Порівняння результатів лікування у пацієнтів IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР в динаміці показано в таблиці 5.1.1.

При оцінці клінічних симптомів у динаміці, у пацієнтів з IgE-залежною формою АР, спостерігалася: через 6 місяців після лікування наявна вірогідна різниця оцінки змін показників за шкалою ВАШ, таких як: ринорея, чихання, свербіж носа та закладеність носа. Через 12 місяців лікування вірогідні зміни спостерігаються з усіма симптомами: чихання, ринорея, свербіж носа, почервоніння та виділення з очей. Аналогічні зміни спостерігаються і при оцінці нижніх симптомів. Вірогідні різниця клінічних симптомів таких як кашель і утруднене дихання спостерігаються через 12 місяців після лікування.

При оцінці клінічних симптомів у динаміці, у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР, було показано, що через 6 місяців вірогідних змін показників оцінки за шкалою ВАШ виявлено не було. Через 12 місяців лікування вірогідні зміни спостерігаються лише за симптомами чихання, свербіж носа, почервоніння та виділення з очей. Однак після 24 та 36 місяців після АСІТ оцінка цих показників

практично не змінюється. Симптоми закладеності носа і ринореї зменшуються тільки через 24 місяці після лікування та залишаються практично без змін після 36 місяців лікування. Аналогічні зміни спостерігаються і при оцінці нижніх симптомів. Вірогідна різниця клінічних симптомів, таких як кашель та утруднене дихання спостерігаються через 12 місяців після лікування та також не змінювались до закінчення АСІТ.

Таблиця 5.1.1.

## Порівняння показників ВАШ на тлі проведення АСІТ з ІgЕ-залежною та ІgЕ-незалежною формою АР

Ознака, мм (0-100)	ІgЕ-залежний АР (n=30)					ІgЕ-незалежний АР (n=30)				
	До лікува- ння	6 міс.	12 міс.	24 міс.	36 міс.	До лікування	6 міс.	12 міс.	24 міс.	36 міс.
Верхні симптоми ( <sup>1</sup> – носові симптоми, <sup>2</sup> – неносові симптоми)										
Чихання <sup>1</sup>	37,0 (26,0; 48,0)	22,0 <sup>^</sup> (16,0; 27,0)	17,0 <sup>^</sup> (12,0; 20,0)	11,0 <sup>^</sup> (8,0; 14,0)	7,0 <sup>^</sup> (4,0; 9,0)	38,0 (23,5; 49,5)	34,5 (18,3; 39,5)	29,0 <sup>^</sup> * (21,3; 36,8)	25,5* (20,5; 45,8)	23,0* (29,5; 55,0)
Ринорея <sup>1</sup>	48,0 (27,0; 64,0)	30,0 <sup>^</sup> (19,0; 38,0)	27,0 <sup>^</sup> (19,0; 36,0)	19,0 <sup>^</sup> (13,0; 25,0)	15,0 <sup>^</sup> (8,0; 21,0)	45,5 (28,0; 56,8)	42,0* (28,5; 48,8)	38,0 <sup>^</sup> * (31,3; 42,0)	27,0* (21,3; 32,0)	28,5* (25,0; 33,8)
Свербіж носа <sup>1</sup>	16,0 (9,0; 24,0)	13,0 (7,0; 18,0)	11,0 <sup>^</sup> (6,0; 15,0)	10,0 <sup>^</sup> (6,0; 14,0)	7,0 <sup>^</sup> (4,0; 12,0)	19,5 (12,0; 26,8)	12,0 (8,0; 17,0)	10,0 (7,0; 17,0)	10,0 (7,0; 14,8)	12,0* <sup>^</sup> (6,3; 16,8)
Закладе- ність носа <sup>1</sup>	44,0 (32,0; 58,0)	34,0 <sup>^</sup> (22,0; 44,0)	26,0 <sup>^</sup> (17,0; 35,0)	17,0 <sup>^</sup> (10,0; 24,0)	14,0 <sup>^</sup> (8,0; 21,0)	39,5 (22,5; 46,8)	37,0 (21,0; 57,3)	28,5 <sup>^</sup> (22,3; 34,8)	26,5* (18,8; 35,8)	24,0* (21,0; 33,0)
Свербіж очей <sup>2</sup>	25,0 (20,0; 33,0)	20,0 <sup>^</sup> (15,0; 27,0)	17,0 <sup>^</sup> (12,0; 26,0)	13,0 <sup>^</sup> (10,0; 16,0)	14,0 <sup>^</sup> (11,0; 17,0)	24,5 (19,0; 29,0)	22,5 (13,3; 20,0)	16,0* (20,3; 29,8)	18,5* (14,0; 26,0)	17,8,0* (16,3; 25,0)
Почерво- ніння очей <sup>2</sup>	40,0 (30,0; 48,0)	31,0 (23,0; 37,0)	21,0 <sup>^</sup> (15,0; 26,0)	14,0 <sup>^</sup> (10,0; 17,0)	9,0 <sup>^</sup> (7,0; 12,0)	46,0 (32,3; 57,0)	30,0 (23,0; 35,0)	33,0* (25,3,0; 37,8)	29,0* (24,3; 36,8)	28,0* (30,3; 43,5)
Виділен-ня з очей <sup>2</sup>	40,0 (30,0; 52,0)	28,0 <sup>^</sup> (21,0; 37,0)	19,0 <sup>^</sup> (14,0; 24,0)	15,0 <sup>^</sup> (12,0; 18,0)	10,0 <sup>^</sup> (7,0; 12,0)	40,5 (30,3; 48,8)	34,0 (21,0; 35,0)	28,5* (25,0; 35,0)	30,0* (24,3; 35,8)	31,5* (32,43; 35,8)

Нижні симптоми (симптоми астми)										
Утруднене дихання	33,0 (25,0; 34,0)	25,0^ (20,0; 31,0)	20,0^ (16,0; 24,0)	13,0^ (10,0; 15,0)	10,0^ (9,0; 12,0)	36,5 (29,5; 42,8)	34,0 (18,3; 34,0)	25,0* (20,0; 32,0)	22,0* (23,0; 33,0)	21,0* (23,0; 32,8)
Кашель	28,0 (21,0; 35,0)	19,0 (14,0; 25,0)	14,0^ (11,0; 18,0)	13,0^ (8,0; 16,0)	11,0^ (7,0; 13,0)	29,0 (22,0; 33,0)	19,0^ (16,0; 22,0)	22,5 (17,3; 28,8)	23,0* (17,3; 25,0)	21,5* (18,0; 25,8)

Примітки: \* –  $p < 0,05$  – між групами дослідження на кожному з етапів спостереження; ^ –  $p < 0,05$  – порівняно з вихідними значеннями





Таким чином, на підставі виконаних досліджень можна зробити висновок, що проведений трьохрічний курс АСІТ продемонстрував точність персоніфікованого вибору алерговакцини на підставі молекулярних досліджень і високу клінічну ефективність у пацієнтів з IgE-залежною формою АР, що підтверджувалось критеріями ВАШ. Тоді як у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР ефективність АСІТ за шкалою ВАШ була нижчою, про що свідчили показники оцінки нижніх та верхніх носових та неносових симптомів за шкалою ВАШ, які були значно вищими у порівнянні з пацієнтами IgE-залежною формою АР.

Мета наших подальших досліджень ґрунтувалась на основі показників клітинного імунітету, зокрема оцінки рівня Т-регуляторних клітин та показників синтезу цитокінів з'ясували можливі механізми менш ефективного лікування у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР.

## **5.2. Стан системної клітинної імунної відповіді у пацієнтів на алергічний риніт із сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу після АСІТ**

АСІТ алергенами *Dermatophagoides pteronyssinus* є ефективним засобом лікування АР, яка викликає довгострокові покращення клінічних показників і імунологічну толерантність [49]. Основні імунологічні механізми АСІТ включають в себе імунну девіацію від патерну Th2 клітин до Th1 клітин, шляхом блокування синтезу антитіл [66,134] і індукції Т-регуляторних лімфоцитів [65]. Також продемонстровано, що у пацієнтів з АР клінічна ефективність АСІТ корелює з імунологічними змінами, як на гуморальному, так і на клітинному рівнях. Перший полягає у зниженні співвідношення IgE/IgG4 та підвищення рівня IgG4. Зміни на клітинному рівні полягають у зниженій імунній відповіді ефекторних клітин таких як Th2, Th9 і Th17, а також плазматичних клітин та підвищенні рівня Th1 клітин [50].

Добре відомо, що алергенспецифічні Т регуляторні лімфоцити відіграють важливу роль в імунологічній індукції толерантності, що спостерігається під час

АСІТ. Вони здатні пригнічувати активацію, проліферацію і ефektorні функції широкого спектру клітин-мішеней, включаючи вроджені лімфоїдні клітини, антигенпрезентуючі клітини і ефektorні Т-клітини (в основному Th9 і Th17).

Регуляторні Т-клітини також вивільняють цитокіни, такі як ІЛ-10 і ТФР- $\beta$ , які мають ключову супресивну активність. Розрізняють дві субпопуляції регуляторних Т-клітин в залежності від їх походження: природні регуляторні Т-клітини, які походять з тимусу і є основною популяцією клітин для контролю аутоотолерантності та індуковані регуляторні Т-клітини, які генеруються із периферичних наївних CD4<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів у відповідь на чужорідні антигени під час АСІТ. Ці субпопуляції Т-регуляторних клітин використовують різні механізми супресії, в той час як природні регуляторні Т-клітини переважно використовують контактні міжклітинні механізми взаємодії. Супресія індукованими Т-регуляторними лімфоцитами здійснюється за допомогою імуномодулюючих цитокінів таких як ІЛ-10 і TGF- $\beta$ . Для регуляторних Т-клітин характерним є білок FoxP3, який є частиною транскрипційного фактора. Цей білок відіграє важливу роль в регуляції експресії генів, що беруть участь у багатьох процесах регуляторних Т-клітин [45].

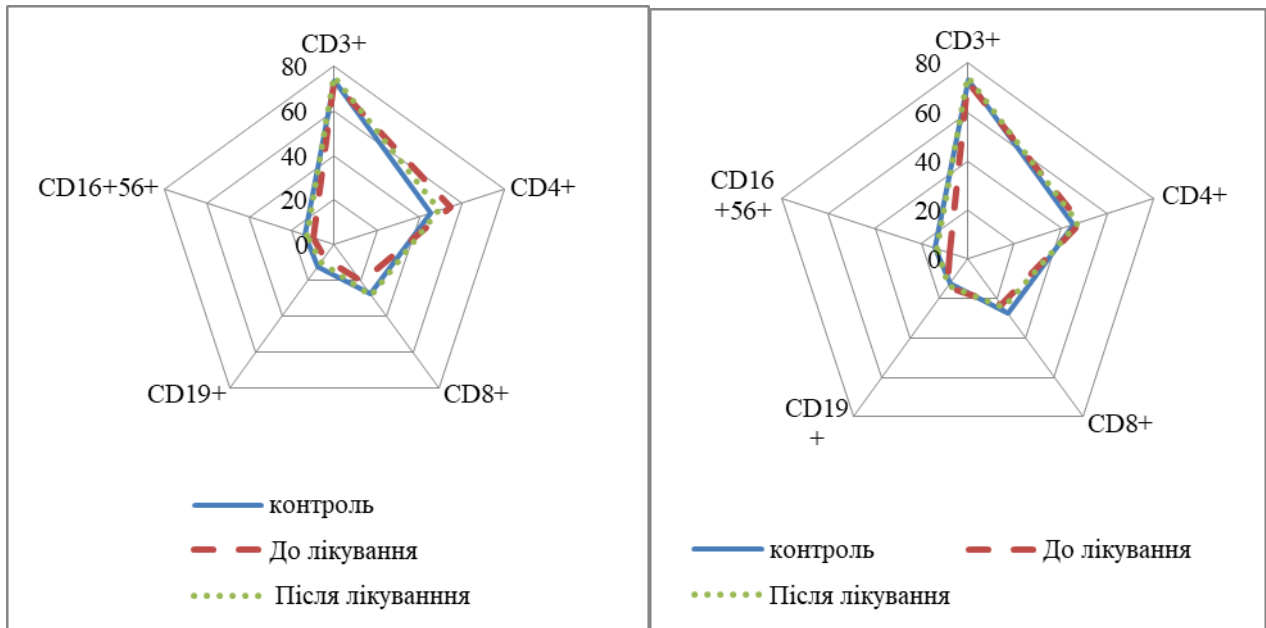
Низка досліджень вказує на підвищення активності Т-регуляторних клітин під час проведення АСІТ, проте інші дослідження не підтверджують такої зміни [49, 51, 82]. Більше того, багато авторів стверджують, що ефективність в значній мірі пов'язана зі зміною рівня ІЛ-10, що продукують Т-клітини 30, пригнічуючи супресією продукцію ІЛ-4 Th2-лімфоцитами, що і призводить до зменшення продукції ІgЕ плазматичними клітинами 17 [38].

Вважають, що під час АСІТ відбувається активізація різних механізмів регуляції, які впливають на функцію алергенспецифічних регуляторних Т-клітин, що призводить до супресії Th2 імунної відповіді. Тому ефективність АСІТ може бути обумовлена не лише збільшенням кількості регуляторних Т-клітин, але їх підвищеною активністю.

Виходячи з вищезгаданого, метою нашого дослідження було встановити зміни чисельності регуляторних Т-клітин до та через 36 місяців після проведення АСІТ у пацієнтів на алергічний риніт із сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу.

Аналіз стану показників чисельності клітинної ланки імунної системи у осіб з ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формою АР представлений на рис. 5.2.1 та рис. 5.2.12. Згідно проведених нами досліджень було встановлено, що у групі осіб з ІgЕ-залежною формою АР після проведення АСІТ загальна кількість CD3+ Т-лімфоцитів у відсоткових значеннях становила  $75,4 \pm 2,47\%$ , що мала тенденцію до зниження, у порівнянні з показниками груп осіб до лікування  $78,1 \pm 3,76\%$ . Однак, у абсолютних значеннях встановлено тенденцію до підвищення числа CD3+ Т-лімфоцитів до  $1,47 \pm 0,09$  Г/л проти  $1,86 \pm 0,44$  Г/л у групі осіб до лікування. Щодо субпопуляцій Т-лімфоцитів, було відмічено, що після проведеної АСІТ число CD4+-лімфоцитів становило  $49,5 \pm 1,46\%$ , що було нижчим проти показників групи осіб до лікування, де встановлено  $54,6 \pm 5,12\%$  CD4+-лімфоцитів. У той час кількість CD8+-лімфоцитів була підвищеною лише у відсоткових значеннях і становила  $28,4 \pm 1,74\%$  проти  $20,8 \pm 4,56\%$  у групі осіб до лікування. Зміна співвідношення Т-лімфоцитів хелперів та Т-лімфоцитів супресорів/цитотоксичних відображена у підвищенні імунорегуляторного індексу CD4/CD8 порівняно із групою контрольних осіб ( $1,74 \pm 0,07$  і  $2,16 \pm 0,55$  відповідно).

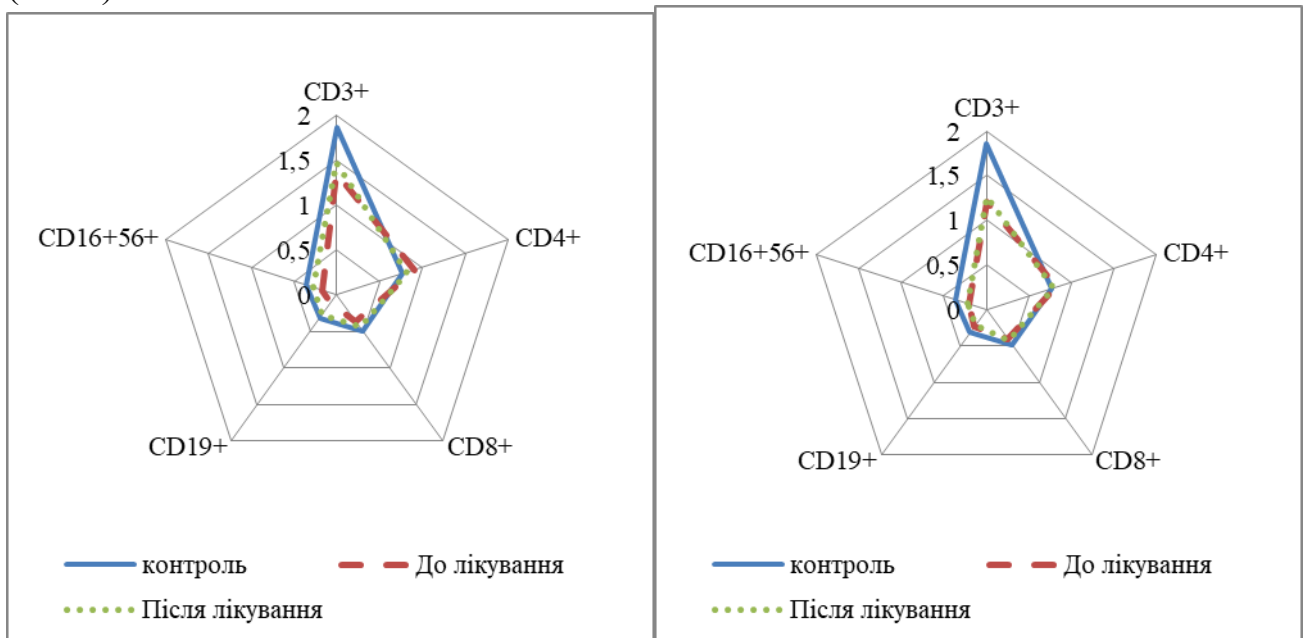
Щодо кількості CD19 В-лімфоцитів то у групі осіб з ІgЕ-залежною формою АР встановлено підвищення їх кількості у абсолютних і відносних значеннях до  $10,2 \pm 0,68\%$  і  $0,27 \pm 0,07$  Г/л відповідно у порівнянні з групою осіб до лікування, де їх значення встановлено на рівні  $7,6 \pm 3,92\%$  і  $0,12 \pm 0,10$  Г/л ( $p < 0,05$ ). Число CD16+56 НК-0,  $17 \pm 0,04$  лімфоцитів не змінювалось у порівнянні з групою осіб до лікування і становила  $10,2 \pm 2,16\%$  ( $0,28 \pm 0,06$  Г/л) та  $12,9 \pm 1,36\%$  ( $0,28 \pm 0,06$  Г/л) відповідно.



IgE-залежний АР

IgE-незалежний АР

**Рис.5.2.1.** Показники клітинної ланки імунної системи (% значення) у пацієнтів з IgE-залежним та IgE-незалежним АР до та після проведення АСІТ (M±m)



IgE-залежний АР

IgE-незалежний АР

**Рис.5.2.2.** Показники клітинної ланки імунної системи (абсолютні значення) у пацієнтів IgE-залежним та IgE-незалежним на АР до та після проведення АСІТ(M±m)

При оцінці аналогічних показників у групі осіб з IgE-незалежною формою АР вірогідних змін рівня числа клітин після проведення АСІТ виявлено не було. Встановлено тенденцію до зниження числа CD4+Т-лімфоцитів хелперів та підвищення рівня CD8+-лімфоцитів як у відносних, так і абсолютних значеннях. Вірогідних змін числа В і NK лімфоцитів також виявлено не було.

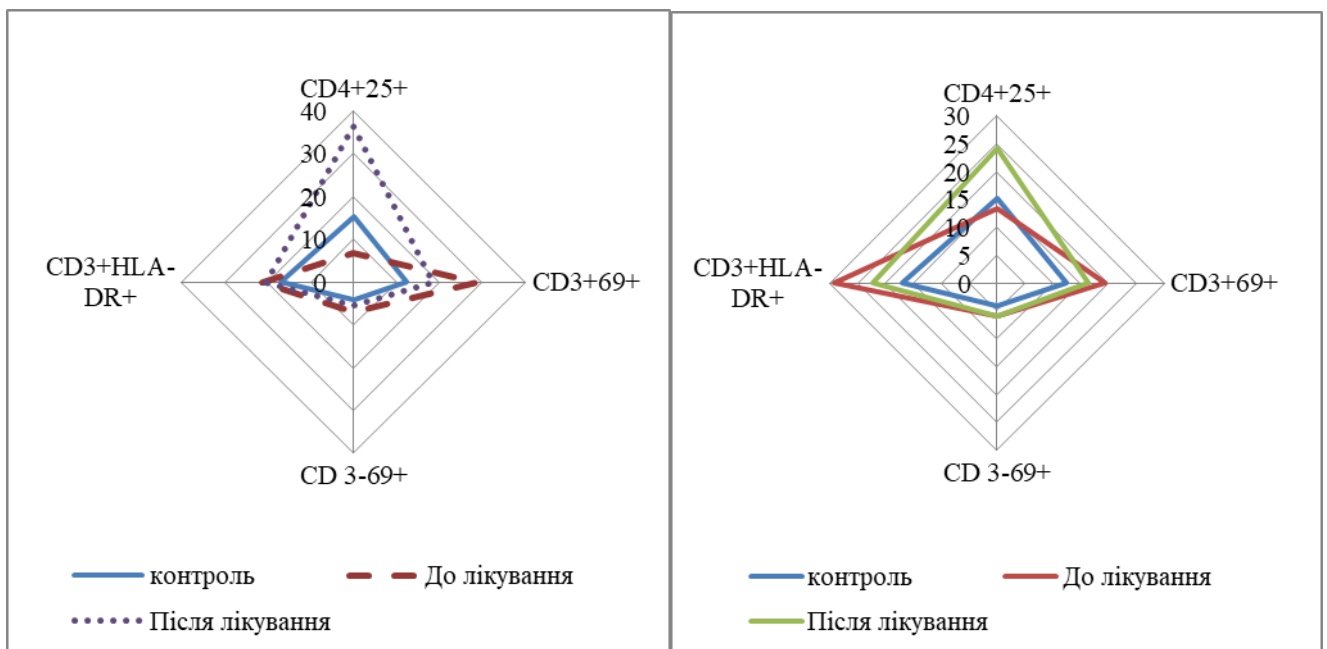
При проведенні порівняння оцінки ефективності лікування між групами з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР за зміною кількості Т, В і NK лімфоцитів встановлено вірогідну відмінність за рівнем CD8+Т-лімфоцитів і В-лімфоцитів. Так, у групі осіб з IgE-незалежною формою АР рівень CD8+Т-лімфоцитів був нижчим і становив  $24,5 \pm 2,33\%$  проти  $28,4 \pm 1,74\%$  у групі осіб IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ ). Однак у абсолютних показниках кількості клітин такої відмінності виявлено не було. Кількість В-лімфоцитів також була вірогідно вищою у групі осіб з IgE-незалежною формою АР, однак лише у відсоткових значеннях і становила  $13,8 \pm 1,14\%$  проти  $10,2 \pm 0,68\%$  у групі осіб з IgE-залежною АР.

З огляду на виявлені нами незначні зміни в кількісному складі популяцій і субпопуляцій лімфоцитів, доцільним було після проведеної АСІТ вивчити також і експресію основних активізаційних маркерів на лімфоцитах у осіб з різними формами АР. Результати досліджень представлені на рис. 5.2.3. та 5.2.4. Аналізуючи показники, цікавим виявився факт, що після проведення АСІТ встановлено підвищення кількості CD4+CD25+ CD127<sub>low</sub> Т регуляторних лімфоцитів у групі з IgE-залежною формою АР до  $17,4 \pm 0,81\%$  проти  $7,5 \pm 1,3\%$  відповідно у групі осіб з АР до лікування ( $p < 0,05$ ). У групі осіб з IgE-незалежною формою вірогідних змін в кількості CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> Т-регуляторних лімфоцитів виявлено не було.

При цьому у групі осіб з IgE-залежною формою АР ці зміни були більш вираженими і відображались як у відсоткових, так і абсолютних значеннях. При оцінці експресії активізаційного маркера CD69 на CD3 і NK-лімфоцитах було виявлено, що після проведеної АСІТ було зниження чисельності рівня

активованих клітин до  $18,6 \pm 1,02\%$  проти  $28,6 \pm 2,1\%$  у групі з IgE-залежною алергією до лікування. Оцінка рівня експресії на CD69 на CD3-лімфоцитах, показала, що у групі осіб з з IgE-залежною формою AP кількість CD3+CD69+-лімфоцитів була зниженою, як у відносних ( $18,6 \pm 1,02\%$ ), так і абсолютних ( $0,39 \pm 0,07$  Г/л) значеннях у порівнянні з групою осіб до лікування. При оцінці експресії маркера CD69 на NK-лімфоцитах вірогідних змін рівня його експресії виявлено не було. При визначенні рівня експресії HLA-DR на лімфоцитах, вірогідні зміни його рівня були виявлені лише у групі осіб з IgE-незалежною формою AP. Так, кількість клітин CD3+ HLA-DR+-лімфоцитів була зниженою у осіб з AP після проведеного лікування і становила  $22,3 \pm 1,91\%$  проти  $29,2 \pm 1,7\%$  у групі осіб до лікування ( $p < 0,05$ ).

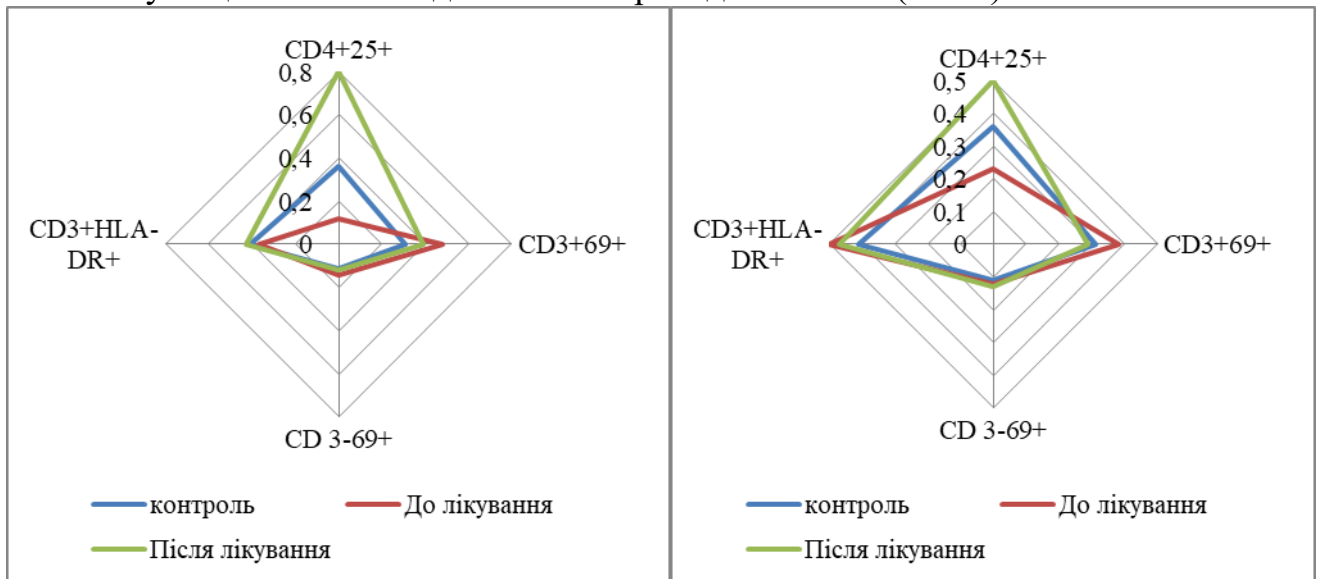
При порівнянні отриманих даних між двома дослідними групами вірогідну відмінність було виявлено за рівнем CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> T регуляторних лімфоцитів. У групі осіб IgE-залежною формою AP кількість T-регуляторних лімфоцитів була вірогідно вищою.



IgE-залежний AP

IgE-незалежний AP

**Рис.5.2.3.** Показники активізаційних маркерів (%) клітинної ланки імунної системи у пацієнтів на АР до та після проведення АСІТ(M±m)



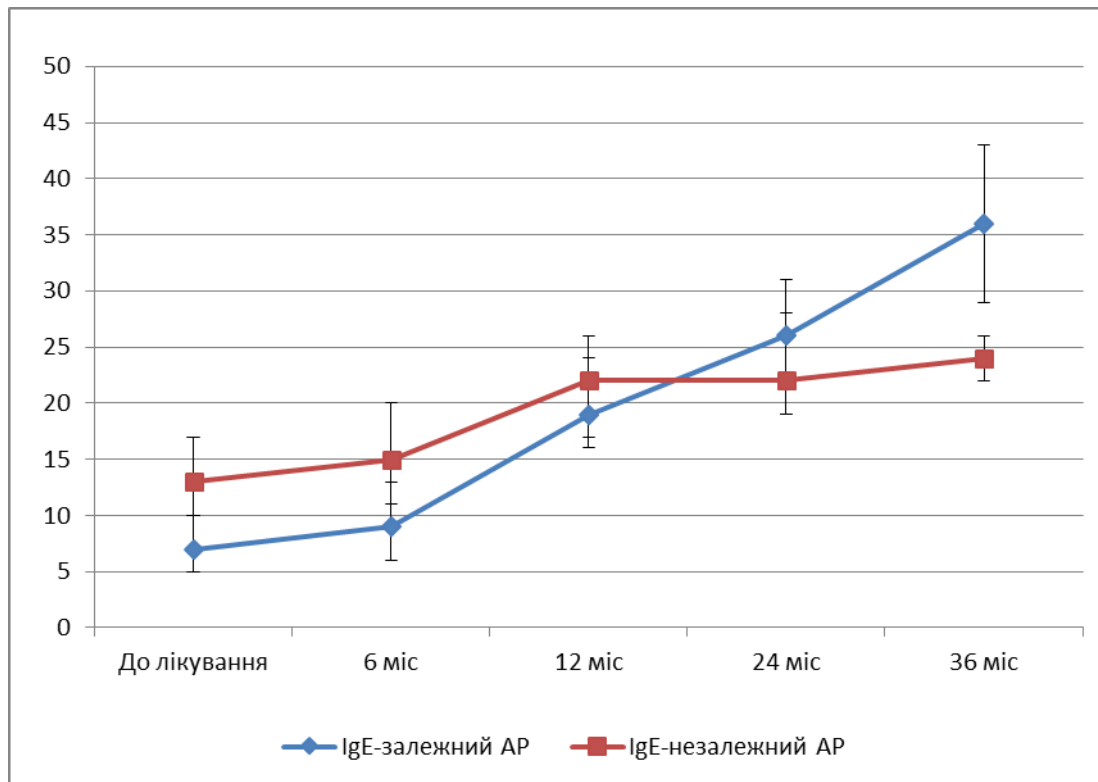
IgE-залежний АР

IgE-незалежний АР

**Рис.5.2.4.** Показники активізаційних маркерів (абс) клітинної ланки імунної системи у пацієнтів на АР до та після проведення АСІТ(M±m)

За даними багатьох досліджень клінічний ефект АСІТ терапії пов'язаний з імунологічними змінами, такими як підвищення рівня sIgG4 блокуючих антитіл  $\text{31}$ , що супроводжуються пригніченням імунологічної відповіді  $\text{Th2}$  лімфоцитів за участю Tregs. За зміною рівня Tregs слідкували в динаміці (рис.5.2.1.)





**Рис. 5.2.1. Рівень  $CD3^+CD4^+CD25^+$  IgE-залежною  $CD127_{low}$  T регуляторних лімфоцитів в динаміці лікування у групі осіб та IgE-незалежною формою AP (n=30).**

Згідно проведених нами досліджень було встановлено, що у групі осіб з IgE-залежною формою AP підвищення кількості Tregs спостерігалось через 12 місяців після лікування до  $19 \pm 1,9$  % та продовжувало підвищуватися до  $26 \pm 2,7$ % через 24 місяці, досягаючи значення  $36,4 \pm 5,8$ % через 36 місяців після лікування, що було вірогідно вищим у порівнянні з цим показником до лікування.

У групі осіб IgE-незалежною формою AP підвищення кількості Tregs також спостерігалось через 12 місяців після лікування до  $22 \pm 2,8$  %, однак вірогідних змін його рівня впродовж подальшого лікування не спостерігалось.

Таким чином, в результаті проведеного дослідження було показано, що у групі осіб з IgE-залежною формою AP після проведеної АСІТ спостерігається підвищення кількості  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127_{low}$  T регуляторних лімфоцитів. У групі осіб IgE-незалежною формою AP кількість  $CD3^+CD4^+CD25^+CD127_{low}$  лімфоцитів вірогідно не змінювалась.

При оцінці експресії інших активізаційних маркерів, виявлено зниження рівня його експресії на CD3+лімфоцитах CD69 лише у групі осіб з IgE-залежною формою АР. При визначенні рівня експресії HLA-DR на лімфоцитах, вірогідні зміни його рівня були виявлені лише у групі осіб з IgE-незалежною формою АР.

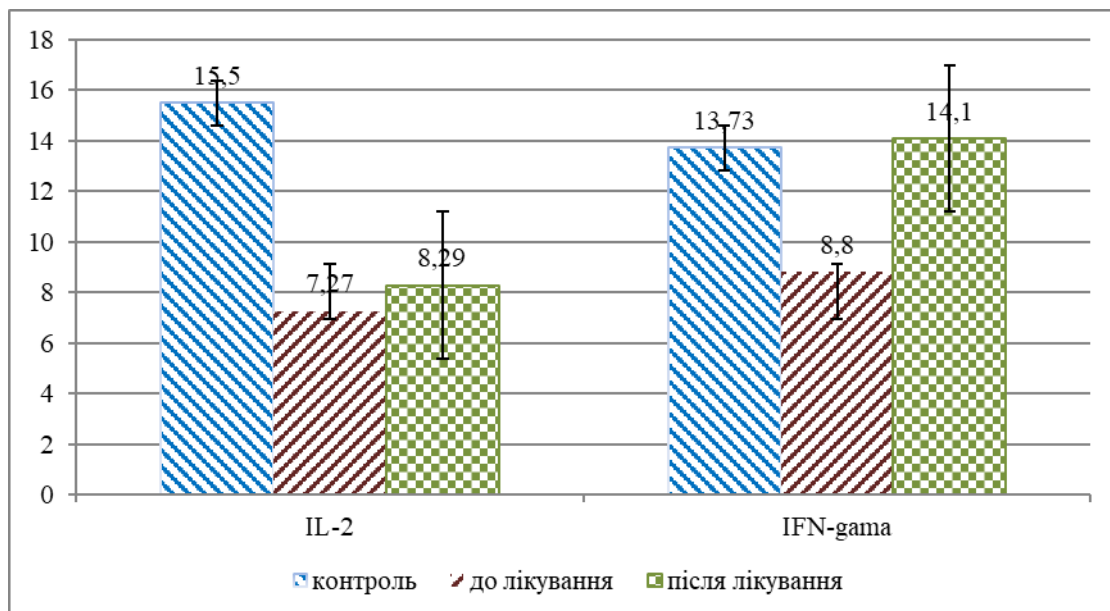
### **5.3. Оцінка цитокінового профілю у пацієнтів на алергічний риніт, викликаний сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу до та після проведення АСІТ**

Враховуючи дані попередніх досліджень, подальшою метою нашої роботи було встановити не лише кількісні зміни імунорегуляторних клітин, а і оцінити їх функціональну активність за рівнем продукції цитокінів до та після застосуванні АСІТ. Для подальшого дослідження проводили оцінку синтезу цитокінів, які були репрезентативні для кожної клітинної субпопуляції. Регуляторну роль Th1 оцінювали за синтезом IL-2 та  $\gamma$ -IFN, маркерами Th2 типу імунної відповіді слугували IL-4, IL-5 та IL-13, функціональну активність Treg оцінювали за рівнем синтезу IL-10 і трансформуючого фактора росту-  $\beta$  (TGF-  $\beta$  ).

На сьогодні відомо, що в розвитку АР імунорегуляторну роль відіграє баланс між Th1 і Th2 лімфоцитами. Вплив АСІТ на регуляторну роль Th1 оцінювали за синтезом IL-2 та  $\gamma$ -IFN [17]. За результатами наших досліджень було встановлено, що після проведеної АСІТ в групі з IgE-залежною формою АР рівень IL-2 мав тенденцію до підвищення і становив  $8,29 \pm 1,2$  пг/мл проти  $7,27 \pm 1,3$  пг/мл до лікування (рис.5.3.1). У пацієнтів з IgE-незалежною формою АР (рис.5.4.2) також встановлено підвищення рівня IL-2 до  $10,2 \pm 0,86$  пг/мл проти  $8,4 \pm 0,97$  пг/мл у порівнянні групою осіб до лікування . Оцінка рівня  $\gamma$ -ІФН показала його підвищення у 1,6 рази до  $14,1 \pm 1,21$  пг/мл лише у пацієнтів I групи у порівнянні з групою осіб до лікування. При порівнянні рівня цитокінів між I і II групами вірогідних відмінностей за рівнем цих цитокінів після проведеної АСІТ виявило не було.

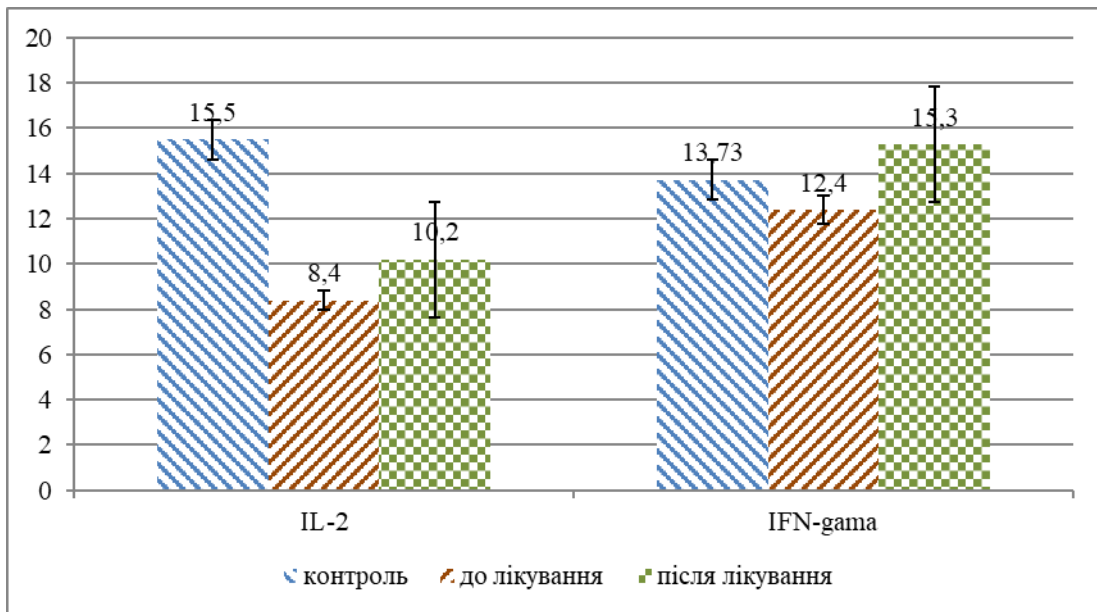
Маркерами активності Th2 типу імунної відповіді слугували рівні продукції ІЛ-4, ІЛ-5 та ІЛ-13 (рис. 5.3.3, 5.3.4). При проведенні аналізу отриманих результатів було показано, що рівень ІЛ-4 у групі з ІgЕ-залежною формою АР знижувався і становив  $16,2 \pm 0,53$  пг/мл проти  $28,8 \pm 2,3$  пг/мл у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). При цьому зниження його рівня було характерним лише для пацієнтів І групи. Оцінка рівня ІЛ-5 показала його зниження у пацієнтів обох груп. Рівень ІЛ-5 у пацієнтів І групи становив  $18,3 \pm 0,54$  пг/мл, а у пацієнтів ІІ групи  $20,4 \pm 0,63$  пг/мл у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,01$ ). При оцінці рівня ІЛ-13 до проведення АСІТ зниження його рівня було також характерним для двох дослідних груп. Оцінка рівня ІЛ-13 після проведення АСІТ показала його зниження у двох дослідних групах до  $44,6 \pm 3,63$  пг/мл і  $53,4 \pm 5,21$  пг/мл проти  $61,22 \pm 8,12$  пг/мл, і  $93,4 \pm 3,82$  пг/мл відповідно у порівнянні з групою осіб до лікування. Однак при порівнянні рівня ІЛ-13 між двома групами пацієнтів після проведеної АСІТ вірогідних змін його рівня виявлено не було.

пкг/мл

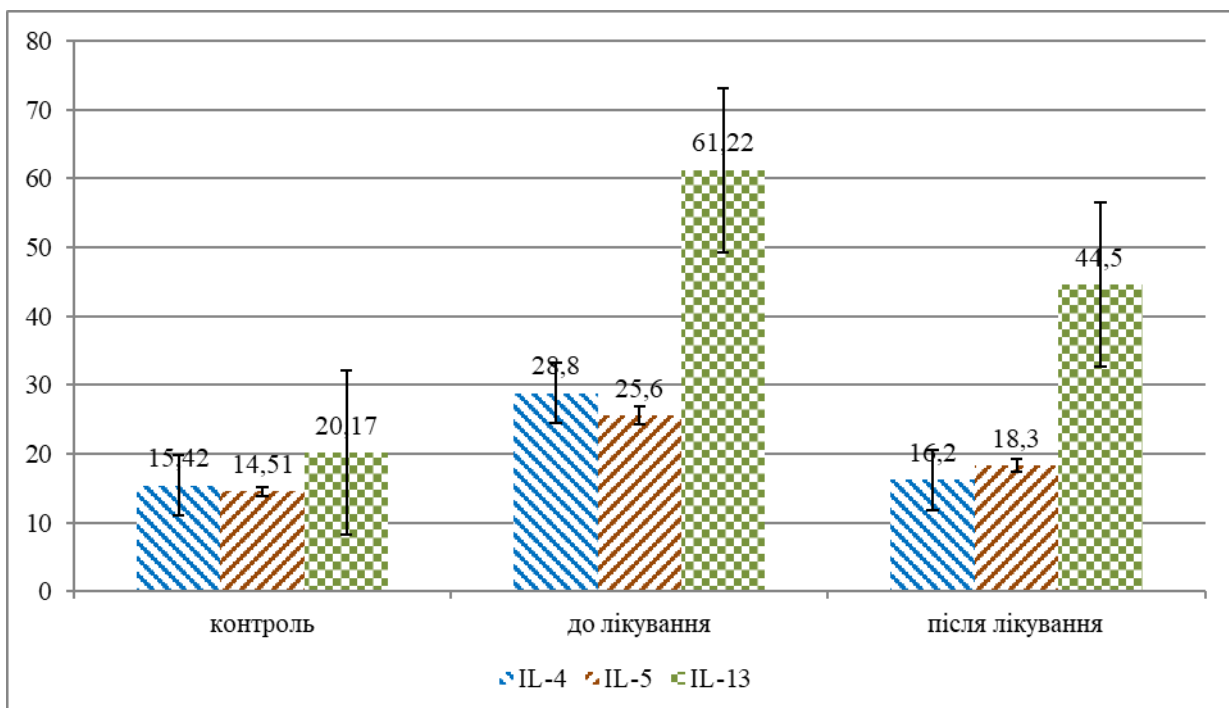


**Рис. 5.3.1. Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами І типу у групі осіб з ІgЕ-залежною формою АР після проведення АСІТ (n=30)**

пкг/мл

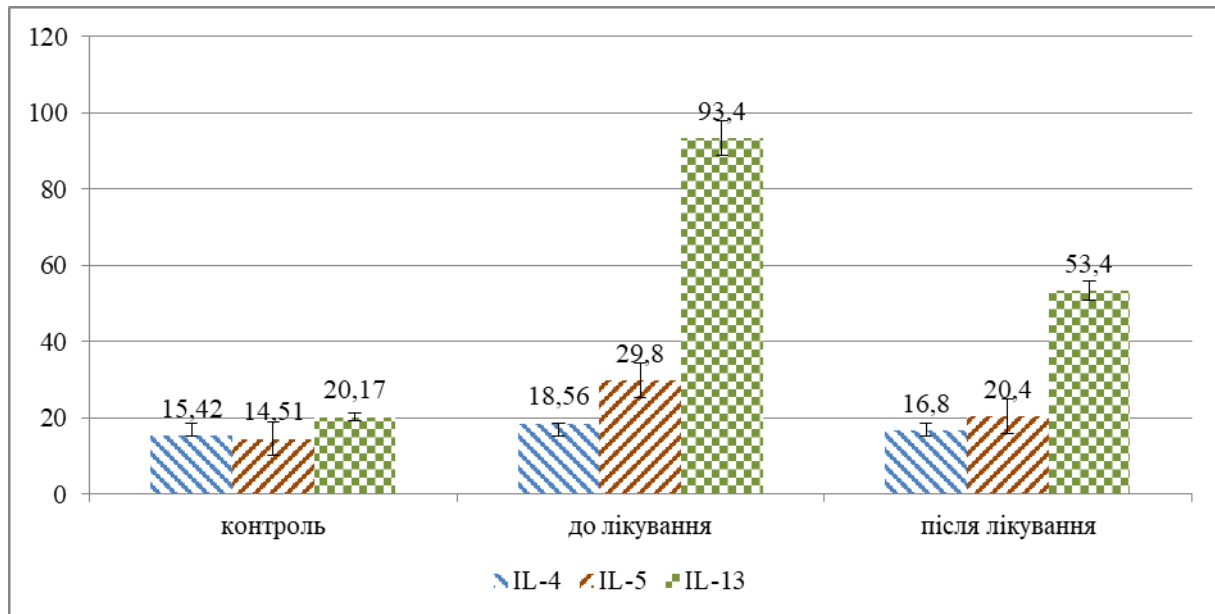


**Рис. 5.3.2 Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами I типу у групі осіб з IgE-незалежною формою АР після проведення АСІТ (n=30)**



**Рис. 5.3.3 Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами II типу у групі осіб з IgE-залежною формою АР після проведення АСІТ (n=30)**

пкг/мл



**Рис. 5.3.4 Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами II типу у групі осіб з IgE-незалежною формою АР після проведення АСІТ (n=30)**

Таким чином, в результаті проведеного дослідження було встановлено підвищення рівня IL-2, IFN $\gamma$  та зниження рівня IL-5,-3,-4, -13 у групі з осіб з IgE-залежною формою АР. У групі осіб з IgE-незалежною формою АР рівень  $\gamma$ -IFN не змінювався, виявлено підвищення IL-2 та зниження IL-5 та IL-13. Однак вірогідних змін рівня цитокінів у досліджуваних групах виявлено не було.

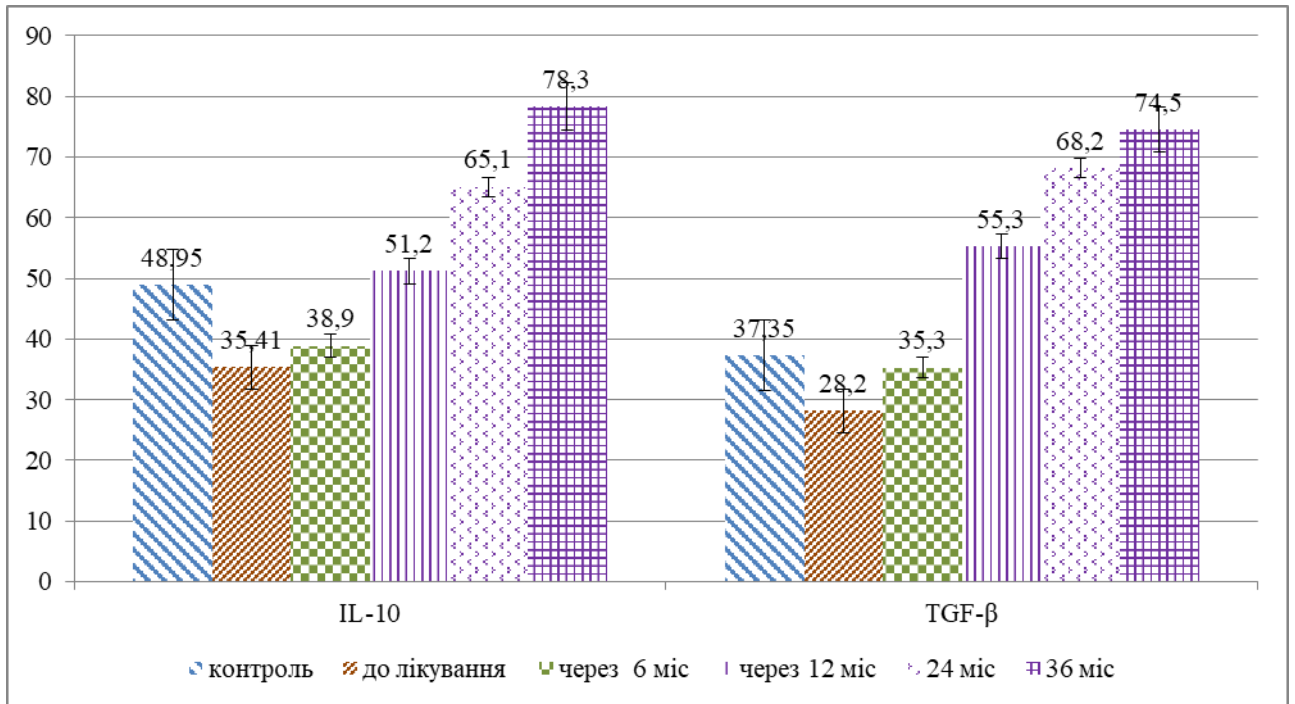
Прийнято вважати, що Treg відіграє ключову роль в індукції толерантності під час АСІТ. Однак існують суперечливі дані щодо ролі цих клітин. Так низка досліджень вказує на збільшення відсотку цих клітин під час лікування 18·26·27·41, інші дослідження цього не підтверджують 28·29. Як відомо, Treg контролюють алергічне запалення шляхом синтезу цитокінів, таких як IL-10 і TGF -  $\beta$  27·50

У зв'язку з цим метою наших досліджень було оцінити зміни активності ІЛ-10 і TGF- $\beta$  у групі осіб з ІgE-залежною та ІgE-незалежною формою АР в динаміці лікування.

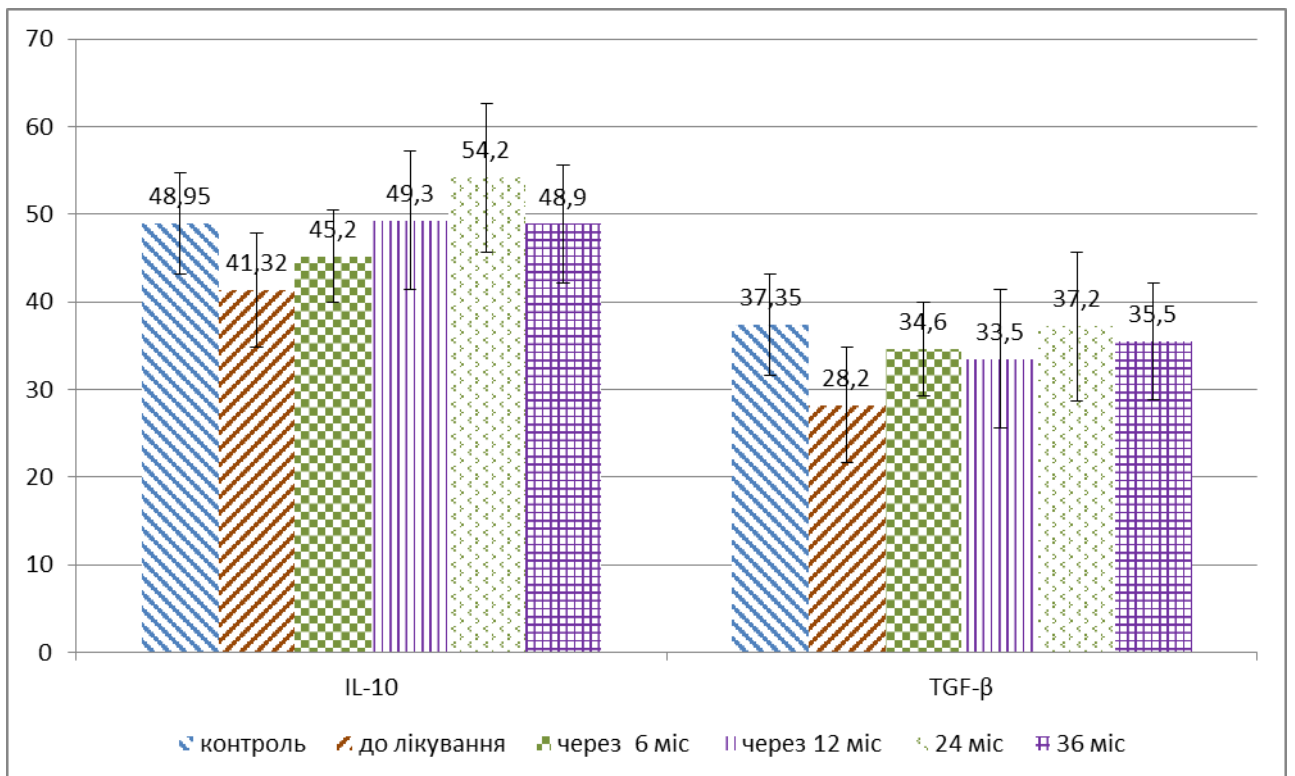
В результаті проведеного нами дослідження (рис. 5.3.5, 5.3.6) було встановлено, що після 6 місяців застосування АСІТ вірогідних змін рівнів продукції ІЛ-10 не спостерігалось як у пацієнтів з ІgE-залежною формою АР, так і в пацієнтів з ІgE-незалежною формою АР у порівнянні з групою осіб до лікування. Рівень продукції ІЛ-10 у осіб з ІgE-залежною формою АР знаходився в межах  $38,52 \pm 1,19$  пг/мл проти  $35,41 \pm 2,18$  пг/мл, у порівнянні з групою осіб до лікування. У пацієнтів з ІgE-незалежною формою АР рівень ІЛ-10 становив  $45,2 \pm 2,45$  пг/мл проти  $41,32 \pm 6,32$  пг/мл відповідно. Однак через 12 місяців після проведеного лікування було встановлено, що у групі осіб з ІgE-залежною формою АР рівень ІЛ-10 вірогідно підвищився до  $51,2 \pm 2,47$  пг/мл у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). Тоді як в групі осіб з ІgE-незалежною формою АР зафіксовано лише тенденцію до підвищення рівня ІЛ-10.

При оцінці рівня TGF- $\beta$  було встановлено підвищення його рівня вже через 6 місяців після проведеного лікування. Так у пацієнтів І групи з ІgE-залежною формою АР рівень TGF- $\beta$  становив  $35,3 \pm 3,24$  пг/мл проти  $28,2 \pm 2,19$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). У пацієнтів ІІ групи з ІgE - незалежною формою АР рівень TGF- $\beta$  черз 6 місяців після лікування був також підвищений і становив  $34,6 \pm 3,23$  пг/мл проти  $28,2 \pm 2,19$  пг/мл. Через 12 місяців після проведеного лікування у групі осіб з ІgE-залежною формою АР рівень TGF- $\beta$  становив  $55,3 \pm 3,24$  пг/мл, а через 36 місяців досяг рівня TGF- $\beta$  становив  $74,3 \pm 3,24$  пг/мл. У групі осіб з ІgE-залежною формою АР рівень TGF- $\beta$  зберігався на досягнутому рівні. При порівнянні рівнів досліджуваних цитокінів між двома дослідними групами вірогідну відмінність було виявлено за рівнем TGF- $\beta$  через 12 місяців після лікування.

пкг/мл



**Рис. 5.3.5 Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами II типу у групі осіб з IgE-залежною формою АР після проведення АСІТ (n=30)**



**Рис. 5.3.6. Рівень сироваткових цитокінів (пкг/мл), що продукуються Т-хелперами II типу у групі осіб з IgE-незалежною формою АР після проведення АСІТ (n=30)**

Таким чином, в результаті проведеного нами дослідження встановлено, що застосування АСІТ призвело до коригування синтезу цитокінів у пацієнтів з IgE-залежною формою АР з сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу. В результаті було показано, що АСІТ сприяє активації функції Treg клітин в обох дослідних групах, що проявлялось підвищенням синтезу TGF- $\beta$  через 6 місяців після лікування та IL-10 через 12 місяців після лікування. У свою чергу на підвищення синтезу цих цитокінів вплинуло і переключення імунної відповіді в бік Th1 типу, що проявлялось посилення продукції IL-2 і IFN- $\gamma$  та зниження продукції IL4, IL5 і IL13. Такі зміни були більш характерними для пацієнтів з IgE-залежною формою АР, тоді як для пацієнтів з IgE-незалежною формою характерним було лише незначне зниження рівня IL-5 і IL-13 та посилення продукції TGF- $\beta$ . Однак впродовж подальшого лікування змін його рівня не спостерігали. Рівень IL-10 також вірогідно не змінювався. Такі зміни можуть свідчити про різні патогенетичні механізми розвитку АР.

Наше дослідження показало, що АСІТ індукує Treg-клітини і ефективно пригнічує алергічну імунну відповідь. Було показано, що переключення імунної відповіді під час АСІТ відбувається за рахунок пригнічення Th2-імунної відповіді за рахунок продукції Treg TGF- $\beta$  на ранніх етапах АСІТ та IL-10 на більш пізньому етапі. Таке пригнічення призводить до зниження рівня Th2 цитокінів (IL-4, IL-5, IL-13), які беруть участь в інгібуванні Th1 58·59·60·61. Хоча Treg клітини з IL-10 опосередкованою супресивною дією представляють собою багатообіцяючі мішені для лікування алергії, необхідні подальші дослідження, які б підтвердили в подальшому виявлені потенційні біомаркери ефективності і для інших видів АСІТ.



#### **5.4. Функціональна активність *in vitro* клітин імунної системи периферичної крові у пацієнтів на алергічний риніт викликаний сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу до та після АСІТ**

Нами були проведені дослідження *in vitro* стану імунітету у хворих з різними клінічними формами АР з вивченням функціональної активності клітин Т-хелперів I типу (за продукцією IL-2 і IFN- $\gamma$ ); Т-хелперів II типу (за продукцією IL-4, IL-5, IL-13); а також Тreg-лімфоцитів периферичної крові пацієнтів за їх здатністю продукувати IL-10 і TGF- $\beta$  після проведення АСІТ.

Дані щодо спонтанної та мітогенактивованої продукції цитокінів, які синтезуються Th1лімфоцитами, в супернатантах клітин крові, отриманих у здорових осіб, і хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР представлені в таблиці.5.4.1.

При оцінці рівня IL-2 у хворих IgE-залежною формою АР було встановлено підвищення його рівня до  $45,9 \pm 3,1$  пг/мл у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). Вірогідне підвищення рівня IL-2 спостерігали і в групі з IgE-незалежною формою АР. Встановлено підвищення його рівня до  $35,8 \pm 4,2$  пг/мл ( $p < 0,05$ ).

При активації клітин крові мітогеном, було встановлено підвищення синтезу IL-2 клітинами. При порівнянні отриманих даних між різними групами хворих було встановлено, що рівень IL-2 у групі хворих з IgE-залежною формою АР був вірогідно вищий у порівнянні з показниками контрольної групи і становив  $74,8 \pm 5,7$  пг/мл проти  $23,7 \pm 0,9$  пг/мл у групі осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). Оцінка IL-2 у групі хворих з IgE-незалежною формою АР показала також підвищення його рівня до  $67,3 \pm 5,8$  пг/мл. При порівнянні інтенсивності спонтанної і індукованої продукції цитокінів між групами з IgE-залежною формою АР та з IgE-незалежною формою АР групам хворих вірогідних відмінностей змін їх рівня виявлено не було.

У зв'язку з тим, що роль IFN- $\gamma$  у становленні алергічного запалення у хворих АР до кінця не з'ясована, нами було проведене дослідження щодо вивчення спонтанної і індукованої продукції IFN- $\gamma$  мононуклеарними клітинами периферичної крові з метою диференціальної діагностики IgE-залежної і IgE-незалежної форм АР, викликаного сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу після проведення АСІТ.

Таблиця 5.4.1.

**Продукція ІЛ-2 та IFN- $\gamma$  мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro* після 12 місяців після проведення АСІТ**

Форма АР	ІЛ-2, пг/мл				IFN- $\gamma$ пг/мл			
	До лікування		Після лікування		До лікування		Після лікування	
	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	18,8 $\pm$ 1,5	23,7 $\pm$ 0,9	45,9 $\pm$ 3,1*	74,8 $\pm$ 5,7*	10,4 $\pm$ 0,8	29,5 $\pm$ 2,5	36,4 $\pm$ 4,2*	65,9 $\pm$ 3,8*
<b>IgE-незалежна (n=30)</b>	23,5 $\pm$ 1,6	38,6 $\pm$ 1,2	35,8 $\pm$ 4,2*	67,3 $\pm$ 5,8*	17,4 $\pm$ 2,1	34,5 $\pm$ 4,2	20,5 $\pm$ 2,7	53,3 $\pm$ 6,4*
<b>Контрольна група (n=30)</b>	25,8 $\pm$ 1,3	43,8 $\pm$ 2,6	-	-	16,4 $\pm$ 0,6	46,5 $\pm$ 3,5	-	-

\*-вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )

\*\* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

Як видно з табл.5.4.1, рівень спонтанної та індукованої продукції клітинами IFN- $\gamma$  у хворих IgE-залежною формою АР був вірогідно вищим і становив 29,5 $\pm$ 2,5пг/мл і 65,9 $\pm$ 3,8пг/мл відповідно у порівнянні з показниками групи осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). У групі хворих із IgE-незалежною формою АР рівень

спонтанної продукції IFN- $\gamma$  практично не відрізнявся від норми, однак рівень індукованої продукції був вірогідно вищим і становив  $53,3 \pm 6,4$  пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Дані щодо продукції IL-4 у супернатантах клітин крові до і після їх стимуляції мітогеном у групах хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР представлені в таблиці 5.4.2. При оцінці спонтанної продукції IL-4 у супернатантах клітин крові у групах хворих з IgE-залежною формою АР було встановлено, що його рівень після лікування був нижчим майже у 1,6 рази і становив  $42,8 \pm 4,2$  пг/мл, мітогенактивована продукція IL-4 була також меншою і рівень продукції IL-4 становив  $85,2 \pm 7,9$  пг/мл. У групі осіб з IgE-незалежною формою АР, рівень спонтанної продукції IL-4 після лікування залишився практично без змін, а рівень індукованої продукції IL-4 був дещо зниженим і становив  $83,4 \pm 5,7$  пг/мл у порівнянні з групою осіб до лікування, однак вірогідних змін його рівня виявлено не було.

Таблиця 5.4.2.

**Продукція IL-4, IL-5 мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro* після 12 місяців після проведення АСІТ**

Форма АР	IL-4 (pg/ml)				IL-5 (pg/ml)			
	До лікування		Після лікування		До лікування		Після лікування	
	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	69,4 $\pm 7,2$	125,6 $\pm$ 13,3	42,8 $\pm$ 4,2*	85,2 $\pm$ 7,9*	78,3 $\pm$ 8,4	205,5 $\pm$ 15,4	52,5 $\pm$ 7,5*	123,4 $\pm 10,2$ *
<b>IgE- незалежна (n=30)</b>	48,4 $\pm 6,5$	98,6 $\pm$ 7,3	52,4 $\pm$ 6,4	83,4 $\pm$ 5,7	32,4 $\pm$ 1,9	139,3 $\pm$ 14,4	42,4 $\pm$ 4,5	76,6 $\pm$ 5,8*
<b>Контрольна група (n=30)</b>	35,7 $\pm 6,5$	75,4 $\pm$ 5,8	-	-	26,8 $\pm$ 2,2	65,8 $\pm$ 6,3	-	-

- \* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )  
 \*\* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

Таблиця 5.4.3.

**Продукція ІЛ-13 мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro* після 12 місяців після проведення АСІТ**

Форма АР	ІЛ-13 (pg/ml)			
	До лікування		Після лікування	
	Спон прод	Індук прод	Спон прод	Індук прод
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	80,3±16,1	142,7±12,8	52,4±12,5*	98,5±9,4*
<b>IgE- незалежна (n=30)</b>	68,8±5,4	184,4±13,1	72,2±13,1	90,3±8,6*
<b>Контрольна група (n=30)</b>	40,7±2,9	91,6±3,8	-	-

- \* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )  
 \*\* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

З огляду на провідну роль еозинофілів у формуванні алергічного запалення і особливий вплив ІЛ-5 на функціональну активність цих клітин, нами проведені дослідження спонтанної і індукованої продукції ІЛ-5 мононуклеарними клітинами крові у хворих з IgE-залежною і IgE- незалежною формами АР після проведеної АСІТ.

При оцінці рівня продукції ІЛ-5 у супернатантах клітин було показано, що у групі хворих з IgE-залежною формою АР спостерігали вірогідне зниження як спонтанної продукції ІЛ-5 до 52,5±7,5 пг/мл, так і стимульованої мітогеном до 123,4±10,7 пг/мл у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). У групі хворих з IgE-незалежною формою АР також спостерігали зниження продукції ІЛ-5. При оцінці спонтанної продукції вірогідних змін рівня ІЛ-5 виявлено не було, а

стимуляція мітогеном призводила до зниження його синтезу до  $76,6 \pm 5,8$  пг/мл, що було майже у 2 рази нижчим у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, після проведення АСІТ, як у групі хворих з IgE-залежною формою АР, так і в групі хворих з IgE-незалежною форми спостерігається зниження рівня індукованої продукції *in vitro* мононуклеарами ІЛ-5, що свідчить про знижену функціональну активність Th2 клітин.

Враховуючи, що роль ІЛ-13 у хворих АР до кінця нез'ясована, нами було проведене дослідження щодо вивчення спонтанної і індукованої продукції ІЛ-13 мононуклеарними клітинами периферичної крові у хворих з IgE-залежною і IgE-незалежною формою захворювання АР, викликаного сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу.

Оцінка продукції ІЛ-13 в умовах *in vitro* показала в групі хворих з IgE-залежною формою АР: спостерігали зниження його рівня до  $52,4 \pm 12,5$  пг/мл і  $98,5 \pm 9,4$  пг/мл відповідно, у порівнянні з групою осіб до лікування ( $p < 0,05$ ). У групі хворих з IgE-незалежною формою АР рівень спонтанної продукції ІЛ-13 практично не змінився, і становив  $72,2 \pm 13,1$  пг/мл, проте рівень мітогенактивованої продукції був зниженим і становив  $90,3 \pm 8,6$  пг/мл у порівнянні з групою хворих до лікування  $184,4 \pm 13,1$  пг/мл ( $p < 0,05$ ).

Багато досліджень вказують саме на те, що серед хворих, які страждають, а саме алергічні хвороби, виявлено порушення у функціональній активності Treg клітин, яке сприяє поляризації Th2 і, отже, синтезу IgE [6].

У зв'язку із цим, нами було проведене дослідження *in vitro* продукції ключових цитокінів (TGF- $\beta$  і ІЛ-10) мононуклеарними клітинами периферичної крові у хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формою АР із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу. Оцінку рівня продукції цитокінів проводили через 6, 12 та 24 місяців після проведеного лікування АСІТ.

Результати досліджень спонтанної та індукованої продукції мононуклеарними клітинами крові ІЛ-10 і TGF- $\beta$  у здорових і хворих осіб з IgE-залежною і IgE-

незалежною формами АР після проведеного лікування представлені в таблицях 5.4.4-5.4.5.

Таблиця 5.4.4

**Продукція ІЛ-10 мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro* після проведення АСІТ**

Форма АР	ІЛ-10 (пг/мл)									
	До лікування		Після лікування 6 міс		Після лікування 12 міс		Після лікування 24 міс		Після лікування 36 міс	
	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	98,5 ± 8,4	589,4 ± 12,5	110,4 ± 14,2	625,2 ± 21,7	123,8 ± 11,4	781,5 ± 22,6*	132,8 ± 11,4	775,5 ± 20,4*	232,8 ± 11,3	790,5 ± 35,6*
<b>IgE-незалежна (n=30)</b>	108,8 ± 8,3	535,4 ± 14,6	104,4 ± 10,8	590,7 ± 11,3	112,1 ± 9,7	612,4 ± 32,1*	124,1 ± 9,7	652,4 ± 24,1*	138,1 ± 19,6	684± 300,1 *
<b>Контрольна група (n=30)</b>	116,9 ± 11,2	558,7 ± 15,6	-	-	-	-	-	-	-	-

\*- вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )

\*\* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з ІgЕ-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

Як показали результати проведених досліджень (табл 5.4.4), після 6 місяців АСІТ у групі осіб з ІgЕ-залежною і ІgЕ-незалежною формами АР достовірної зміни рівня спонтанної і індукованої продукції ІЛ-10 не відмічалось. Рівень індукованої продукції ІЛ-10 становив  $625,2 \pm 21,7$  пкг/мл і  $590,7 \pm 11,8$  пкг/мл

відповідно, у порівнянні з групою осіб до лікування. Тоді, як при оцінці рівня TGF- $\beta$  (табл.5.4.5.) виявлено посилення його синтезу мононуклеарами периферичної крові як за умов спонтанної, так й індукованої продукції. Посилення синтезу TGF- $\beta$  зафіксовано у обох дослідних групах. У групі з IgE-залежною формою АР зафіксовано збільшення рівня продукції майже у 2 рази до  $165,2 \pm 8,7$  пкг/мл, а в групі осіб з IgE-незалежною формою АР його рівень становив  $412,5 \pm 14,6$  пкг/мл, що було вірогідно вищим у порівнянні з групою осіб до лікування у відповідних групах ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 5.4.5

**Продукція TGF- $\beta$  мононуклеарними клітинами крові в умовах *in vitro* після проведення АСІТ**

Форма АР	TGF- $\beta$ (пкг/мл)									
	До лікування		Після лікування 6 міс		Після лікування 12 міс		Після лікування 24 міс		Після лікування 36 міс	
	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод	Спон прод	Інду к прод
<b>IgE-залежна (n=32)</b>	63,3 $\pm$ 1,4	86,1 $\pm$ 11,7	84,5 $\pm$ 9,5	165,2 $\pm$ 8,7*	95,2 $\pm$ 10,2	182,3 $\pm$ 11,6	135, 8 $\pm$ 19,4	257,5 $\pm$ 36,6*	147,4 $\pm$ 21,1	379,2 $\pm$ 23,5*
<b>IgE-незалежна (n=30)</b>	174,6 $\pm$ 11,6	218,6 $\pm$ 15,2	125,6 $\pm$ 11,2	312,5 $\pm$ 14,6*	157,8 $\pm$ 5,4	326,7 $\pm$ 26,4	164, 1 $\pm$ 9,7	352,4 $\pm$ 24,1*	188,1 $\pm$ 19,6	368 $\pm$ 30,1*
<b>Контроль на група (n=30)</b>	79,53 $\pm$ 3,2	105,6 $\pm$ 13,5	-	-	-	-	-	-	-	-

\*- вірогідна різниця показників у порівнянні з групою здорових осіб ( $p < 0,05$ )

\*\* - вірогідна різниця показників у порівнянні з групою з IgE-залежною формою АР ( $p < 0,05$ )

Цікавим виявився факт: через 12 місяців лікування було встановлено, що рівень спонтанної продукції IL-10 у групах з хворих IgE-залежною і IgE-незалежною формами АР був підвищеним у порівнянні з групою осіб до лікування, однак вірогідні зміни його продукції зафіксовані лише у групі осіб з IgE-залежною формою АР. При порівнянні результатів рівня індукованої продукції IL-10, у двох групах хворих було показано, що індукований мітогеном рівень його продукції був вищим у групі IgE-залежною формою АР, і становив  $781,5 \pm 22,6$  пг/мл і  $612,4 \pm 32,1$  пг/мл відповідно ( $p < 0,05$ ).

Через 36 місяців після лікування рівень спонтанної та індукованої продукції IL-10 у групі осіб з IgE - залежною формою АР був стабільно високим і становив  $232,8 \pm 11,3$  пкг/мл і  $790,5 \pm 35,6$  пкг/мл .

Щодо особливостей синтезу TGF- $\beta$ , то було показано (табл.5), що вірогідних змін його рівня через 12 місяців лікування виявлено не було у порівнянні з групою осіб, яким проводили оцінку через 6 місяців лікування.

Таким чином, у даних групах хворих на АР спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції *in vitro* клітинами IL-10 лише через 12 місяців після проведення АСІТ, тоді як підвищення індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro* встановлено вже через 6 місяців після лікування.

У групі осіб з IgE-залежною формою АР рівень IL-10 та TGF- $\beta$  продовжували наростати впродовж лікування, а в групі осіб з IgE-незалежною формою вірогідних змін їх синтезу виявлено не було. Таким чином, у хворих IgE-залежною формою АР, на відміну від IgE-незалежної, спостерігалось достовірне підвищення показників спонтанної та індукованої продукції IL-10 і TGF- $\beta$  клітинами *in vitro*, тоді як у хворих з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищення рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

Отже, в результаті проведеного дослідження встановлено, що після проведеної АСІТ рівень продукції цитокінів Th1 типу IL-2 і IFN- $\gamma$  посилюються. При цьому в групі осіб з IgE-залежною формою АР зафіксовано посилення синтезу як типу IL-2 , так IFN- $\gamma$ , тоді як в групі з IgE-незалежною формою АР встановлено



лише посилення синтезу ІЛ-2. Відомо, що порушення синтезу ІЛ-2 приводить до дефектів функціонування Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, натуральних кілерів. Покращення секреції ІЛ-2 активованим антигеном мононуклеарами призводить до активації багатьох типів клітин, залучаючи їх в імунну відповідь.

Щодо особливостей продукції цитокінів Th2 типу, то в результаті проведеного дослідження показано, що застосування АСІТ призвело до зниження мітогенактивованої продукції ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13 у групі осіб з ІgЕ-залежною АР і зниження мітогенактивованої продукції ІЛ-5, ІЛ-13 у групі осіб з ІgЕ-незалежною формою АР.

Отримані результати вказують на те, що при після проведеної АСІТ при ІgЕ-залежній формі АР потенціал клітин щодо синтезу ІЛ-4 послаблюється, і таким чином, рівень активації Th2-лімфоцитів знижується шляхом підвищення синтезу ІЛ-10 та TGF- $\beta$ , що у результаті може призвести до зниження синтезу ІgЕ.

Дані проведеного дослідження представлені у публікаціях [Юр'єв С.Д., Курченко А.І. Алгоритм відбору пацієнтів з алергічним ринітом і сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу для проведення алергентерапії //; Зубченко С., Чопяк В., Колінковський О., Юр'єв С., Шарікадзе О. Порівняльний аналіз альтернативних методів діагностики профілю сенсibilізації пацієнтів Західного регіону України; Імунологія та алергологія: наука і практика - 2019. - № 1. - С. 46-53. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_1\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_1_7); Зубченко С.О., Гайдучок І.Г., Юр'єв С.Д., Чопяк В.В. Оцінка клінічної ефективності алергенімунотерапії у пацієнтів з алергічними хворобами // Імунологія та алергологія: Наука і практика. 3-4'2020 doi:10.37321/immunology.2020.3-4-08 ].

## РОЗДІЛ 6 АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В останні десятиліття проблема алергії набуває все більшої актуальності. У першу чергу спостерігається ріст поширеності алергічних захворювань, особливо в економічно та соціально розвинутих регіонах світу. Фахівці також констатують факти значного «омолодження» АЗ, тобто зміщення їх початку на більш ранній вік, зміну структури алергопатології, схильність до поширення тяжких клінічних форм, формування коморбідних станів тощо. АР є найбільш поширеним із усіх АЗ на який страждає близько 400 млн. осіб у всьому світі, і проявляє себе зниженням якості життя пацієнтів, зниженням продуктивності праці, успішності, розвитком ускладнень тощо. Згідно рекомендацій експертної робочої групи ARIA та Всесвітньої організації охорони здоров'я АР є одним із найбільш значимих факторів ризику розвитку бронхіальної астми [18, 95]. Серед джерел алергенів КДП є найбільш поширеним джерелом інгаляційних алергенів. Поширеність алергії до кліщів коливається залежно як від географічного регіону, так і житлових умов та може коливатися в досить широких межах. Згідно проведених нами досліджень зареєстровано 50% осіб із сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу [3, 146]. Сенсibiliзація до кліщів домашнього пилу часто є причиною виникнення таких захворювань, як бронхіальна астма, атопічний дерматит та АР та ін. [18, 34, 139].

Для проведення дослідження верифікацію алергопатології проводили у 112 пацієнтів за наступними клінічними ознаками: у 85 (75,9%) хворих були скарги на періодичне/постійне чхання, у 77 (68,7%) – на періодичну ринорею, у 84 (75,0%) – на закладеність носа, у 74 (66,1%) – на свербіж носа/очей, у 54 (48,2%) – на ринокон'юнктивіт, у 44 (39,3%) – на сухість шкірних покривів, у 29 (26,9%) – еритематозно-сквамозні висипання на шкірі верхніх кінцівок, верхньої частини грудної клітки, шиї тощо зі свербіжем, у 25 (22,3%) – рецидивний бронхо-обструктивний синдром (БОС).

Найчастіше серед обстежених пацієнтів був діагностований персистивний (цілорічний) АР у 31 (27,7%) осіб та інтерміттивний (сезонний) АР у 29 (25,8%) осіб; найменше виявлено пацієнтів з БА інтермітуючою або легкою персистуючою, контрольованою формою – 4 осіб і коморбідність – БА інтермітуюча або легка персистуюча, контрольована/АР інтерміттивний – 4 особи, що склало по 3,6%. Майже з однаковою частотою верифіковані БА інтермітуюча або легка персистуюча, контрольована/АР цілорічний – 7 (6,3%) пацієнтів і хронічна часто рецидивуюча кропив'янка – 8 (7,1%) осіб, а також атопічний дерматит (АД) дорослого типу, локалізована еритематозно-сквамозна форма, легкого ступеня тяжкості (SCORAD від 14,00% до 22,00%), неповна або повна ремісія – 14 осіб (12,5%) та коморбідність – АР персистивний і АД – 15 (13,4%) пацієнтів.

На першому етапі метою нашої роботи було провести порівняльний аналіз альтернативних методів оцінки гіперчутливості до різних груп причинно-значимих алергенів у дорослих пацієнтів та встановити найбільш поширені джерела респіраторних алергенів.

Для виконання поставленої мети була відібрана група пацієнтів у кількості 52 осіб з різними діагнозами, яким після проведення ШПТ екстрактами алергенів КДП, виконували компонентні дослідження. Зауважимо, що хворим зі шкірними проявами в анамнезі ШПТ, проводили у фазі ремісії.

За результатами ШПТ виявлено: у 25 хворих (48,1%) – алергенами кліщів домашнього пилу (КДП) *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*. Причому, у 36 (69,2%) пацієнтів виявлена полісенсibiliзація. Розподіл моносенсибилізованих пацієнтів був наступним: 5 (9,6%) мали позитивні ШПТ лише до обох КДП, 3 (5,7%) – до тимофіївки лучної, 3 (5,7%) – до цвілевих грибків *A. Alternata*, 3 (5,7%) – до kota, 2 (3,8%) – до берези.

За результатами молекулярних досліджень – близько половини обстежених осіб виявили позитивну реакцію до алергенів КДП, причому порівну до екстракту *Dermatophagoides farinae* (50,0%) і *Dermatophagoides pteronyssinus* (50,0%).

При порівнянні результатів ШПТ з результатами молекулярної діагностики звертає на себе увагу висока ступінь співпадіння результатів алергодіагностики цими двома методами. Серед головних компонентів/груп білків КДП переважали Der f 2 (NPS2 Family), Der p 2 (NPS2 Family).

Порівняльний аналіз *in vitro* та *in vivo* методів алергодіагностики вказує на задовільну збіжність результатів при застосуванні більш економічно доступного метода дослідження – ШПТ. Без сумніву, ШПТ не володіють такою високою селективністю алергодіагностики, проте за сумарним результатом є достатньо надійними, що ще раз підкреслює їх багаторічну значущість як способу первинної діагностики сенсibilізації організму, а також економічну вигоду для пацієнта. Уточнення за молекулярним профілем може здійснюватися в подальшому за вибірковим принципом, особливо для пацієнтів з полісенсibilізацією чи прихованою сенсibilізацією, а також як високоточний, персоніфікований метод для вибору АІТ і прогнозу її ефективності.

Алергени КДП вважаються одними з найбільш поширених чинників астми та алергічного риніту у світі. Втім, як вважається, лише 1-2 % світової популяції має чутливість до алергенів кліщів. І хоча ця цифра, на перший погляд, здається незначною, насправді, алергічна чутливість до КДП значно варіює між країнами. Крім того, є дані, що серед атопічної популяції, щонайменше 50% пацієнтів з бронхіальною астмою та 45% пацієнтів з алергічним ринітом мають сенсibilізацію до кліщів домашнього пилу [142].

Основними алергенами з названих вважаються цистеїнові протеази Der p 1 та Der f 1, відповідно, *Dermatophagoides pteronyssinus* та *Dermatophagoides farinae* [27]. Чутливими до останніх, за літературними даними, є більше 80% людей із алергією до КДП [27].

Втім, останнім часом значного клінічного значення набув ще один білок, Der p 23, який також називають мажорним компонентом кліща домашнього пилу [90]. Цей алерген є перитрофіноподібним білковим доменом (PF01607).

Перитрофіноподібним протеїном є і Der f 23, а Der f 37 – це білок, що містить перитрофін-А домен [6].

Інші алергени кліщів, що мають клінічне значення, являються Der p 5, Der p 7, та Der p 21. Причому, за літературними даними, найбільш виражені алергенні властивості з цього переліку має Der p 7 [29]. Втім, ці дані можуть бути релевантними лише для пацієнтів, для яких проводилося дослідження. Адже, як вважається, на швидкість сенсibilізації впливає кілька факторів, включаючи вік пацієнта, географічний регіон, полі- або моносенсibilізацію, сенсibilізацію до певних джерел алергенів [92].

Відтак, різниця в чутливості населення до цих та інших алергенних компонентів кліщів визначає клінічний перебіг алергічного захворювання й стратегії їх лікування. І хоча респіраторну алергію до кліщів домашнього пилу часто можна контролювати за допомогою симптоматичних ліків, у деяких пацієнтів не вдається досягти задовільного контролю над хворобою [92].

Для визначення профілю сенсibilізації до кліщів домашнього пилу були отримані дані 16309 жителів з 16 регіонів України, що пройшли діагностику алергії за допомогою молекулярного тесту ALEX2. Пацієнти проживали в усіх географічних регіонах України – Лісовій, Лісостеповій та Степовій зонах. Найбільше протестованих пацієнтів, 19,62 %, проживали у столиці України м. Києві (Лісова зона), 14,48 % – у м. Одесі, 7,7 % – у м. Харкові (Степова зона), 7,55 % – у Дніпрі (Лісостеп).

Після первинної оцінки отриманої бази даних за географічною приналежністю та віком пацієнтів, до подальшого аналізу були включені дані 10651 осіб, регіон проживання та вік яких можна було встановити достеменно. Серед них було 6163 (57,86 %) дітей віком до 18 років та 4488 дорослих (42, 14 %).

Дані щодо сенсibilізації до алергенів Der p 1, Der p 2 та Der p 23 мають важливе клінічне значення, бо, як зазначено авторами [101], рання сенсibilізація до цих алергенів пов'язана з розвитком бронхіальної астми. Вважається, що

пацієнти з астмою чутливі до більшої кількості алергенних компонентів кліщів, ніж ті, хто не страждає на астму. А сенсibilізація до Der p 1 і Der p 23 до п'яти років є важливим предиктором розвитку бронхіальної астми у шкільному віці [111].

Клінічна роль алергенів Der p 5 та Der p 7 на сьогодні не до кінця вивчена. Наші дані показали її відносно невелику поширеність серед української популяції. Найчастіше вона зустрічалася у людей, полісенсibilізованих одночасно до всіх мажорних алергенів кліщів груп 1, 2, Der p 21 та Der p 23. Моносенсibilізація до Der p 5 та Der p 7 спостерігалася у менш як 1 % обстежених українців.

Сенсibilізація до Der p 7 також може бути маркером розвитку астми. Як зазначають автори Surin Mirela та ін., пацієнти, які мали антитіла IgE до Der p 7, частіше мали проблеми з диханням та показували вираженішу тенденцію щодо розвитку бронхіальної астми, хоч і легкого ступеню, ніж пацієнти, що не були сенсibilізовані до Der p 7 [29].

Також є відомості, що пацієнти з АР реагують на більшу кількість алергенів КДП і частіше сенсibilізовані до Der p 23 і Der p 7 [142]. Відтак, характер сенсibilізації до алергенів КДП може потенційно вказувати на особливості клінічного перебігу, яку можна очікувати у окремих пацієнтів. Особливості профілю сенсibilізації пацієнта також можуть бути предиктором успіху лікування алергії до КДП. Адже єдиним методом лікування, що модифікує прояви хвороби, є АСІТ. Як SCIT, так і SLIT з екстрактами КДП демонструють безпеку та ефективність у зменшенні симптомів алергії та вживання ліків, а також у покращенні якості життя для лікування АР та астми. АСІТ також має ефект довгострокової ремісії після припинення лікування та запобігає новій сенсibilізації [138]. Підбір АСІТ у пацієнтів з сенсibilізацією до різних алергенів КДП та прогнозування її ефективності можна здійснювати на основі даних молекулярної сенсibilізації окремих пацієнтів. Так, за інформацією Surin et al. [36], основним обмеженням вакцин на основі екстракту алергенів КДП, які використовуються в сучасній терапевтичній практиці, є те, що в природних

екстрактах КДП міститься недостатня кількість таких важливих алергенів, як Der p 5, Der p 7 як імуногенний компонент для адекватної відповіді імунної системи. Тому вакцини на основі екстракту алергену можуть бути менш ефективними у пацієнтів, чутливих до цих алергенів. Адже існує гіпотеза, що переважно Der p 2 і Der p 1 є імуногенними алергенами, тоді як інші молекули алергенів в екстракті виявляли низьку імуногенність і, отже, не індукували IgG-відповіді, яка є ключовою у розвитку толерантності. Rodríguez-Domínguez A et. al. вивчали ефективність АСІТ у пацієнтів з різними профілями сенсibilізації та встановили, що АСІТ індукувала захисні IgG, в основному, проти Der p 1 і Der p 2 і в меншій мірі до Der p 23, але не до інших важливих алергенів, таких як Der p 5, Der p 7 і Der p 21 [113]. Це демонструє кращу клінічну ефективність АІТ у пацієнтів, сенсibilізованих лише до Der p 1 та/або Der p 2, порівняно з пацієнтами, які мають сенсibilізацію до інших алергенів. Натомість, Thomas Stranzl та співавтори [122] показали, що алергени для сублінгвального введення містять імунологічно значущі кількості всіх трьох основних алергенів кліщів домашнього пилу для індукції Der p 23-специфічного IgG4 під час проведення КДП SLIT. Також автори зробили висновок, що стратифікація пацієнтів на основі сенсibilізації до Der p 23 до початку АСІТ не має клінічного значення.

В українській популяції найчастіше зустрічаються пацієнти, чутливі до алергенів групи 2 та до Der p 23, а пацієнти, що мають сенсibilізацію до Der p 5, 7, 20, 21 зустрічаються доволі рідко. Це вказує на те, що більшості пацієнтам рекомендована АІТ, за умов наявності клінічних проявів алергії.

Тому відбір пацієнтів з алергією до кліщів відповідно до профілів молекулярної сенсibilізації може підвищити ефективність АСІТ. Для досягнення позитивного результату після лікування необхідний індивідуальний підбір АСІТ. Також потрібні нові клінічні дослідження щодо клінічної релевантності окремих алергенів КДП та стратегії оптимізації препаратів для АСІТ для покращення її ефективності у пацієнтів, що мають сенсibilізацію до алергенів Der p5, Der p 7, Der p 20.

Враховуючи попередні дані дослідження, найчастіше серед обстежених пацієнтів був діагностований персистивний (цілорічний) АР, 31 (27,7%) осіб, а серед найпоширеніших джерел респіраторних алергенів у пацієнтів були пилки злакових трав, КДП.

Враховуючи вище сказане, наступним етапом нашого дослідження було проведення порівняльного аналізу альтернативних методів оцінки гіперчутливості у осіб із алергією до кліщів домашнього пилу у двох групах пацієнтів з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР.

В результаті проведеного дослідження було встановлено, що серед двох груп пацієнтів з IgE-залежною та IgE-незалежною формою АР розбіжностей за кількістю позитивних шкірних тестів і визначенням специфічних IgE до екстрактів алергенів КДП виявлено не було. Зауважимо, що обґрунтований вибір алергенімунотерапії до КДП базується на виявленні у пацієнта мажорних компонентів [8]. За результатами проведених досліджень у групи осіб з IgE-залежною формою АР, сенсibilізація до КДП в основному спостерігалась до компонентів Der p 1, Der p 2 і Der f 1, Der f 2 (82%), сенсibilізація до Der p 5, Der p 7, Der p 11 спостерігалась рідше і становила 32% серед обстежених пацієнтів. Сенсibilізація до перехресно-реактивного алергену Der p 10 зустрічалась лише у 2% пацієнтів. За рівнем визначення специфічних антитіл серед обстежених пацієнтів рівень специфічних IgE до компонентів алергенів в більшості випадків знаходився в межах 5-15 kU/L. Така ж тенденція спостерігалась у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР.

З огляду на все вище сказане, головними алергенами кліщів домашнього пилу є Der p 1 (цистеїнова протеаза) і Der p 2 (сімейство NPC2). Більш ніж у 80% пацієнтів, сенсibilізованих до кліщів домашнього пилу, в сироватці визначаються специфічні IgE-антитіла до одного або двох компонентів [36]. Таким чином, Der p 1 і Der p 2 можуть бути маркерами специфічної сенсibilізації і, в подальшому, застосовані при проведенні АСІТ [49, 51].



На сьогодні відомо, що АР викликає запалення слизової оболонки носа при повторному попаданні алергену у сенсibilізованих осіб. На розвиток цього захворювання має значення вплив алергену, а також імунологічні і генетичні фактори. Однак молекулярні механізми, які лежать в основі запального процесу, який викликає алергію, до кінця не з'ясовані. Основна рання імунна фаза характеризується IgE-опосередкованим вивільненням попередньо утвореного гістаміну із активованих тучних клітин, що приводить до посилення регуляції прозапальних цитокінів і молекул адгезії. Пізня фаза характеризується вивільненням заново утворених медіаторів – таких як лейкотрієни і активацією ефекторних клітин, рекрутованих із лімфатичної тканини і циркулюючої крові. Показано, що циркулюючі лейкоцити і їх підгрупи суттєво відрізняються в крові пацієнтів з АР і здорових осіб. Таким чином, місцеве запалення слизової оболонки носа при дії алергену викликає системні запальні реакції [20].

Доведено, що Т-лімфоцити-хелпери є основними учасниками запальної алергічної реакції дихальних шляхів. Поляризація в сторону Th2 лімфоцитів в основному стимулюється IL-4, але може також індукуватися вивільненням TSLP, IL-25, IL-33 цитокінів. Основними ефекторними цитокінами Th2 лімфоцитів є IL-4, IL-5, IL-13, які стимулюють В-лімфоцити на синтез IgE, активацію еозинофілів, вивільнення гістаміну і лейкотрієнів із тучних клітин. Цитокіни, які продукуються Th2 лімфоцитами додатково пригнічують диференціювання Th1 лімфоцитів. Співвідношення Th1/Th2 і Treg/Th2 лімфоцитів знижуються в слизовій оболонці носа пацієнтів з АР [33].

Існують дані і про роль інших популяцій Т-лімфоцитів в розвитку АР. В низці досліджень показано підвищення рівня Th9-лімфоцитів, Th17 –лімфоцитів та Th22-лімфоцитів та їх ефекторних цитокінів у пацієнтів з АР. В одному із досліджень вказано, що Th22-лімфоцити і їх основний ефекторний цитокін IL-22 були підвищеними у периферичній крові пацієнтів з АР із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу [53, 127, 135].

Іншою важливою популяцією Т-лімфоцитів, з якою пов'язують розвиток алергічного запалення, є популяція Treg лімфоцитів, які є імуномодулюючими клітинами, що секретують TGF $\beta$  і IL-10; вони пригнічують активацію Th2 шляхом інгібування продукції IL-4, IL-5, IL-9 і IL-13, блокують міграцію ефektorних Т-лімфоцитів у місце запалення і додатково індукують синтез В-лімфоцитами IgG4 замість IgE [124].

На сьогодні відомо і про участь в імунних реакціях при АР ВЛК. ВЛК є імунними клітинами лімфоїдної лінії, які не експресують поверхеві маркери Т- і В-лімфоцитів. ВЛК групи 2 (ВЛК 2) секретують IL-5, IL-9, IL-13, зв'язуючи адаптивну і вроджену імунну відповідь при алергічних захворюваннях. Індуковане алергеном вивільнення IL-25, IL-33, TSLP епітеліальними клітинами дихальних шляхів, викликає секрецію цитокінів ВЛК 2 і стимулює запальну Th2 відповідь, а також реактивацію Т-клітин пам'яті [115]. Цікавим є те, що кількість циркулюючих ВЛК була більша у осіб із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу, але не із сенсibilізацією до полину в період сезону пилкування [37].

НК-клітини відіграють важливу роль у посередництві між вродженим і набутим імунітетами, наприклад, взаємодія з дендритними клітинами. НК-клітини класифікуються на IFN- $\gamma$ , секретуючі NK1 і і IL-4, IL-5 і IL-13, секретуючі NK2 клітини [140]. При АР більш високий відсоток циркулюючих НК-клітин і цитотоксичність були продемонстровані для IL-4 NK2, але не для IFN- $\gamma$  NK1 у порівнянні з контролем без атопії, що корелює з підвищеними рівнями IgE [69].

Проаналізувавши вище вказану інформацію, наступним етапом нашої роботи була оцінка стану системного клітинного імунітету у пацієнтів із різними формами АР, сенсibilізованих до КДП, для з'ясування можливих патогенетичних відмінностей у цих групах хворих. Необхідно відзначити, що комплексних досліджень щодо зміни кількості імунокомпетентних клітин периферичної крові у хворих АР в літературі виявилось недостатньо або вони мали різноспрямований характер. Також відсутні дані про дослідження щодо особливостей кількісних змін клітин імунної системи при IgE-залежній і IgE-незалежній формі АР.

Окрім того, поширеність алергії до КДП є глобальною проблемою, оскільки саме алергія до кліщів домашнього пилу - головний фактор ризику розвитку астми. Експериментальні дані свідчать про те, що алергенспецифічні Th2-клітини відіграють ключову роль в алергічній запальній імунній відповіді [41, 42]. Однак, незважаючи на високу поширеність алергії на КДП, точна природа клітинних і молекулярних механізмів, які ініціюють і регулюють цю Th2-зміщену імунну відповідь, до цього часу залишається невідомою.

З огляду на це цікавою є оцінка стану системної імунної відповіді при сенсibiliзації до КДП при IgE-залежній та IgE-незалежній формі АР. Згідно з отриманих нами даних як у пацієнтів з IgE-залежною, так і у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР, встановлено підвищення кількості CD4 Т-лімфоцитів хелперів, однак, лише у відсоткових значеннях, у абсолютних значеннях вірогідних відмінностей за кількістю клітин виявлено не було. Існують дані і про те, що наївні CD8+Т-цитотоксичні володіють здатністю продукувати цитокіни, які приймають участь в алергічному запаленні і стимулюють переключення активності В-лімфоцитів на продукцію імуноглобулінів класу IgE на В-лімфоцитах [114]. Нещодавно було запропоновано залучення цих клітин у розвиток запалення слизової оболонки носа у пацієнтів з атипичним АР [103]. Однак роль цих клітин в розвитку АР до кінця не з'ясована. В деяких дослідженнях повідомляється про зниження рівня Т-лімфоцитів цитотоксичних в крові [19]. Проте інше дослідження вказувало на відсутність змін у співвідношенні CD4/CD8 у пацієнтів з АР до і під час сезону пилкування [60]. Оцінка кількості CD8+-лімфоцитів у наших дослідженнях також показала тенденцію до їх зниження у двох групах пацієнтів лише у відсоткових значеннях. Зміна співвідношення Т-лімфоцитів-хелперів та Т-лімфоцитів супресорів/цитотоксичних була відображена і у підвищенні імунорегуляторного індексу CD4/CD8. Однак вірогідних відмінностей за кількістю Т-лімфоцитів між двома групами пацієнтів з різними формами АР встановлено не було. В-лімфоцити активуються безпосередньо антигенпрезентуючими Т-лімфоцитами,

сприяючи розвитку Th2 шляхом індукції продукції ІЛ-2 [73], або шляхом контакту з алергеном. У проведених нами дослідженнях зниження кількості В-лімфоцитів було відмічено лише у пацієнтів з ІgE-залежною формою АР, що може свідчити про те, що при АР циркулюючі в крові В-лімфоцити, очевидно рекрутуються в слизову оболонку носа, де і відбувається переключення їх синтезу на ІgE. В крові пацієнтів з АР сенсibiliзованих до пилку рослин у частини алергенспецифічних В-лімфоцитів виявлена адаптивна В-клітинна відповідь пам'яті, що робить їх потенційним джерелом алерген специфічних ІgE при наступному впливі алергену [137]. Зниження кількості ІgE+В-лімфоцитів було виявлено у пацієнтів з АР після АСІТ без кореляції між рівнем ІgE+ В-клітин в крові і рівнями циркулюючого ІgE [58]. У проведених нами дослідженнях зниження кількості В-лімфоцитів було відмічено лише у пацієнтів з ІgE-залежною формою АР, що може свідчити про те, що при АР циркулюючі В-лімфоцити, очевидно рекрутуються в слизову оболонку носа.

Низка інших досліджень демонструє вагому роль НК-клітин при АР. Так, зокрема, показано, що НК-клітини пригнічують ефект ІЛ-5 і інгібують ІgE-залежну, але не ІgE-незалежну активацію тучних клітин. На моделі мишей з АР зниження кількості НК клітин викликало збільшення еозинофілії в слизовій оболонці і периферичної крові та підвищення рівня ІЛ-5 [69]. Проведене нами дослідження показало, що у групі з ІgE-залежною формою АР кількість CD16+56 НК-лімфоцитів було вірогідно нижчим у відсоткових і абсолютних значеннях. Однак вірогідних відмінностей їх кількості між групою осіб з ІgE-залежною і ІgE-незалежною формою АР виявлено також не було.

Низка досліджень переконливо доводить вагому роль Т-регуляторних клітин у розвитку алергічного запалення [106, 108]. Про кількість регуляторних клітин судили за визначенням рівня експресії CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sub>low</sub> на поверхні Т-лімфоцитів-хелперів. Відомо, що регуляторні Т-клітини експресують цілий спектр функціональних молекул. Серед них як Т-регуляторний клітинний маркер використовують CD25 (α-ланцюг рецептора ІЛ-2, ІЛ-Rα) і FOXP3. Дані

про здатність регуляторних CD4+CD25+-Т-клітин пригнічувати алергічні процеси отримані в контрольованих умовах експериментів *in vivo* і *in vitro*. Так, в експериментальній моделі бронхіальної астми введення регуляторних CD4+CD25+Fоxp3+-клітин, індукованих TGF- $\beta$ , запобігало розвиток патології у мишей, сенсibilізованих алергенами кліщів [108]. І, навпаки, зменшення вмісту CD4+CD25+-Т-клітин викликало накопичення Th2-клітин та індукцію еозинофільного запалення дихальних шляхів. У проведених нами дослідженнях було встановлено зниження кількості CD3+CD4+CD25+CD127<sub>low</sub> Т регуляторних лімфоцитів лише у групі осіб з IgE-залежною формою АР.

Окрім оцінки кількості популяцій і субпопуляцій лімфоцитів крові пацієнтів на АР із сенсibilізацією до КДП проводили оцінку їх функціональної активності за рівнем експресії поверхневих активізаційних маркерів. Відомо, що різні маркери активації, такі CD69, CD71 і HLA-DR, експресуються на поверхні Т-клітин після стимуляції [69, 135]. У проведеному нами дослідженні відмічено посилену експресію HLA-DR на Т-лімфоцитів у двох обстежених групах. Окрім того, наші результати показали, що експресія антигену CD69 на Т-лімфоцитах (CD3+CD69+), у пацієнтів з IgE-залежною формою АР була вищою, у порівнянні з пацієнтами з IgE-незалежною формою АР. Підвищену експресію CD69 зафіксовано і на інших типах клітин, оскільки рівень CD3-CD69+-лімфоцитів був також підвищеним. Існують дослідження, які підтверджують посилення експресії CD69 на NK-клітинах пацієнтів з АР [83]. Висока експресія CD69 на NK-клітинах у пацієнтів з АР свідчить про те, що ці клітини можуть активуватися, що може бути причиною посиленої цитотоксичності у пацієнтів з АР за рахунок впливу цитокінів, які синтезуються алергенспецифічними Т-клітинами та активованими моноцитами. Інше дослідження проведене на моделі астми у мишей, виявили, що CD69 відіграє критичну роль в індукції АГ-індукованого еозинофільного запалення дихальних шляхів і гіперреактивності дихальних шляхів, а введення моноклональних анти-CD69 антитіл призвело до значного зниження ступеня запалення [99]. Окрім того, посилення експресії CD69 виявлено в різних

захворюваннях, в тому числі і при алергії на коров'яче молоко [48]. Ці результати свідчать про те, що рецептор ранньої активації CD69 є внутрішнім модулятором імуноалергічних процесів шляхом негативної регуляції індукованих алергеном ефекторної відповіді Т-клітин.

Таким чином, отримані нами результати відображають, що як у групі пацієнтів з IgE-залежною, так і IgE-незалежною формою АР з сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу спостерігаються системні порушення стану імунної системи, однак вірогідних змін рівня цих показників виявлено не було. У групі пацієнтів з IgE-залежною формою АР окрім підвищеної кількості Т-лімфоцитів хелперів, зафіксовано зниження НК-клітин та вірогідне зниження кількості Т-лімфоцитів регуляторних. Оцінка активізаційних маркерів показала посилення експресії CD69, HLA-DR на Т-лімфоцитах, а у пацієнтів з IgE-залежною формою АР ще і, ймовірно, на НК-клітинах. Тоді як кількість Treg клітин була вірогідно зниженою лише у пацієнтів з IgE-залежною формою АР. Отримані результати потребують подальшого дослідження, що в майбутньому може стати основою для нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

На сьогодні доведено, що одним із ефективних методів лікування АР є АСІТ [61]. Тим не менш деякі пацієнти не отримують оптимального ефекту від лікування. На сьогодні немає чітко встановлених маркерів, які дозволяють проводити моніторинг змін при АСІТ та оцінювати ефективність лікування. Тому пошук нових механізмів розвитку АР дозволить визначити маркери клінічної відповіді на АСІТ та покращити лікування таких хворих. Робочою групою Європейського товариства алергологів і клінічних імунологів було запропоновано декілька груп маркерів ефективності АСІТ до яких відносяться і цитокіни. Однак даних щодо їх застосування в практиці недостатньо.

У зв'язку з цим, метою нашого дослідження було оцінити цитокіновий профіль сироватки крові пацієнтів АР сенсibilізованих до КДП та встановити роль цитокінів у регуляції синтезу IgE, що в подальшому може стати мішенню для нових підходів до лікування та оцінки ефективності лікування АР.

На сьогодні достатньо добре вивченим є IgE залежні механізми АР. У розвитку АР імунорегуляторну роль відіграє баланс між Th1 і Th2 лімфоцитами. Експериментальні дані свідчать про те, що сенсibilізовані Th2-клітини відіграють центральну роль в алергічній запальній відповіді, індукують продукцію алергенспецифічних IgE, беруть участь у рекрутуванні еозинофілів в тканини, сприяють збільшенню проникливості ендотелію, що в свою чергу сприяє накопиченню запальних клітин в легенях, продукції слизу і модулюванні скорочення гладких м'язів дихальних шляхів. Відомо, що Th2 цитокіни IL-4, IL-5, IL-13 керують цими запальними процесами: IL-4 важливий для алергічної сенсibilізації та продукції IgE, виживання еозинофілів залежить головним чином від IL-5, тоді як IL-13 проявляє себе плейотропними ефектами в легенях, в тому числі відіграє центральну роль у розвитку АНР і ремоделювання тканин [41].

Однак нещодавні дослідження показали про існування інших не-IgE-залежних механізмів, які сприяють розвитку АР [18, 88]. Недавні дослідження чітко продемонстрували, що не тільки дисрегуляція адаптивної імунної відповіді, а також порушення в роботі вродженої імунної системи відіграють критичну роль ініціації і розвитку Th2 алергічної відповіді. У нещодавніх роботах підкреслювалося, що не тільки імунні клітини, але й епітеліальні клітини бронхів і кератиноцити, дійсно можуть безпосередньо активуватися алергенами кліщів домашнього пилу [136].

В останні роки стало відомо, що епітеліальні клітини дихальних шляхів, першими піддаються впливу інгаляційних алергенів і не можуть розглядатися тільки як клітини, що володіють пасивною бар'єрною функцією. Тривала активація епітеліальних клітин алергенами, являє собою один з ключових етапів процесу сенсibilізації клітин Th2, який призводить до вивільнення великої кількості прозапальних цитокінів, хемокінів, факторів росту, що підсилюють Th2 клітини, дендритні клітини, еозинофіли, базофіли та інші запальні клітини [71].

На сьогодні відомо, що алергени завдяки своїй ферментативній протеолітичній активності можуть безпосередньо активувати епітеліальні клітини

і в кінцевому результаті приводити до Th2-залежної імунної відповіді, викликаючи запалення дихальних шляхів [14]. Також нещодавно стало відомо, що деякі алергени можуть безпосередньо впливати на синтез прозапальних цитокінів або індукувати синтез цитокінів епітеліальними клітинами. В свою чергу, клітини епітелію під впливом різних тригерних факторів, в тому числі і алергенів, синтезують IL-33, IL-25, TSLP, які впливаючи на активність «вроджених лімфоїдних клітин» типу 2 (ILC2), спонукають їх до синтезу тих же цитокінів, що і продукують Th2-лімфоцити - IL-5, IL-13, які в подальшому також впливають на В-лімфоцити і викликають синтез IgE [46, 61]. Саме підвищення рівня ILC2 спостерігали в периферичній крові дітей з AP сенсibiliзованих до кліщів домашнього пилу. При цьому їх рівень корелював із важкістю AP [125]. Інше дослідження продемонструвало, що алергени кліщів домашнього пилу індукують синтез IL-33 та IL-25 [139], які, в свою чергу, впливають на активність ILC2, що в результаті призводить до розвитку алергічних захворювань.

У проведеному нами дослідженні регуляторну роль Th1-лімфоцитів оцінювали за синтезом IL-2 та  $\gamma$ -IFN. Маркерами Th2 - типу імунної відповіді слугували IL-4, IL-5 та IL-13. Іншу підгрупу Th лімфоцитів представляють регуляторні T-лімфоцити, які здійснюють супресивний вплив на розвиток запалення опосередкованого Th1 і Th2 лімфоцитами. Відомо, що як кількісна, так і функціональна недостатність T-регуляторних клітин викликає розвиток алергічного запалення поряд з підвищенням активності Th2 лімфоцитів. Treg клітини контролюють алергічне запалення шляхом синтезу IL-10 і TGF- $\beta$ .

У проведеному нами дослідженні показано, що для пацієнтів з IgE-залежним AP характерним було посилення відповіді Th2 лімфоцитів на алерген, який відображався в значно підвищених рівнях продукції IL-4, IL-5 і IL-13, що в подальшому призводило до розвитку еозинофілії і синтезу IgE. Для пацієнтів з IgE-незалежною формою AP характерним було підвищення рівня IL-5 та IL-13. При цьому рівень IL-13 був вірогідно вищим у порівнянні з IgE-залежною



формою АР. Така направленість імунної відповіді була зумовлена порушеним дисбалансом між цитокінами, що продукуються Th1 і Th2 лімфоцитами і Т регуляторними клітинами.

На сьогодні відомо, що ІЛ-2 відіграє важливу роль в патогенезі АР шляхом його впливу на активність Т-регуляторних клітин. Недостатність ІЛ-2 призводить до зниження диференціації і проліферації Treg клітин, а підвищення рівня ІЛ-2 навпаки покращує їх активацію [78]. Зміни рівня ІЛ-2 спостерігали у двох групах, однак при проведенні порівняння його рівня між двома дослідними групами пацієнтів вірогідних змін його рівня виявлено не було. Зниження рівня  $\gamma$ -ІФН було характерним лише для пацієнтів з ІgЕ-залежним АР. Також відомо, що активність Treg клітин є ключовим регуляторним механізмом, за рахунок якого організм підтримує імунну толерантність та запобігає надмірній активації Th2 лімфоцитів. Крім того, відомо, що Treg клітини запобігають активації ІLC2 та синтезу ними ІЛ-4 [78]. При проведенні нашого дослідження було встановлено що у пацієнтів із ІgЕ-залежним АР, на відміну від ІgЕ- незалежного АР, спостерігається вірогідне зниження показників як ІЛ-10, так і TGF- $\beta$ . Отримані результати можуть свідчити про те, що недостатність функціональної активності Treg клітин сприяє як поляризації імунної відповіді в сторону Th2 лімфоцитів, так і посиленню синтезу цитокінів ІLC2 клітинами, що в результаті призводить до розвитку алергії.

Таким чином, у результаті проведеного нами дослідження було демонстровано, що розвиток алергічного запалення у пацієнтів з ІgЕ-залежним та ІgЕ-незалежним АР із сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу асоціюється з дисбалансом між Th1 і Th2 лімфоцитами, а також зниженням функції Treg клітин в обох дослідних групах. Стає очевидним, що ініціювання імунної відповіді за участю Т-лімфоцитів хелперів є результатом складної взаємодії декількох молекулярних шляхів, що включають адаптивний і вроджений імунітет. Однак повне з'ясування молекулярних взаємодій, які керують імунною відповіддю, можливе при кращому розумінні ролі цитокінів у цих процесах.

Виходячи із вище сказаного, подальшою метою нашої роботи було оцінити рівень функціональної активності клітин у продукції цитокінів у пацієнтів із різними формами АР сенсibiliзованих до кліщів домашнього пилу в умовах *in vitro* для з'ясування можливих патогенетичних відмінностей у цих групах хворих. Необхідно відзначити, що комплексних досліджень функціональної активності імунокомпетентних клітин периферичної крові у хворих АР за їхньою здатністю продукувати різні цитокіни *in vitro* у доступній літературі виявилось не достатньо. Також відсутні дані про дослідження особливостей функціональної активності *in vitro* клітин імунної системи при IgE-залежній і IgE-незалежній формі АР. Для з'ясування особливостей синтезу цитокінів у двох дослідних групах було проведено дослідження з вивчення синтезу цитокінів за умов *in vitro*.

Нами були проведені дослідження *in vitro* з вивчення оцінки стану імунітету у хворих з різними клінічними формами АР з вивченням функціональної активності клітин Т-хелперів I типу - за продукцією IL-2 і IFN- $\gamma$ ; Т-хелперів II типу - за продукцією IL-4, IL-5, IL-13; а також Тreg-лімфоцитів периферичної крові пацієнтів - за їх здатністю продукувати IL-10 і TGF- $\beta$ .

У результаті проведеного нами дослідження встановлено, що у групі хворих з IgE-залежною формою АР спостерігається зниження продукції цитокінів, які продукуються Th1 лімфоцитами, а саме IL-2, IFN- $\gamma$ , посилення продукції цитокінів, які продукуються Th2 лімфоцитами як IL-4, IL-5, IL-13. Порушення дисбалансу між Th1/Th2 лімфоцитами супроводжувалось зниженням продукції супресивних цитокінів IL-10 і TGF –  $\beta$ . Таким чином, у даних групах хворих на АР спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції цитокінів *in vitro* клітинами, що призводить до розвитку алергічного запалення та посилення синтезу IgE.

У групі хворих із IgE-незалежною формою АР, на відміну від IgE-незалежної, спостерігався дисбаланс синтезу цитокінів Th1 і Th2 лімфоцитів. Однак вірогідних змін рівня IFN- $\gamma$  встановлено не було. Спостерігалась така сама тенденція до зміни їх рівня Th2 цитокінів, однак значення показників їх рівня

були дещо нижчими. Цікавим виявилось те, що у групі хворих з IgE-залежною формою спостерігали достовірне зниження показників спонтанної та індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro*, тоді як у хворих з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищенням рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

Отже, цитокіни відіграють центральну роль у патогенезі алергічних захворювань. Тому розуміння механізмів, які регулюють синтез і функцію цитокінів, є досить важливим, бо може призвести до розвитку більш ефективних методів лікування.

Єдиним патогенетично обумовленим методом лікування алергічних захворювань, який був визнаний Всесвітньою організацією охорони здоров'я, є АСІТ. АСІТ полягає у багаторазовому введенні сенсibilізованим особам причинно-значущих алергенів у субпорогових дозах, що призводить до активації імуномодуючих механізмів і забезпечення стійкої ремісії симптомів під час подальшого впливу природних алергенів [133].

Дослідження ефективності АСІТ проводили у пацієнтів із АР та сенсibilізацію до КДП. Метою нашої роботи було проаналізувати клінічну ефективність АСІТ пацієнтів з IgE-залежною і IgE-незалежною формами АР. АСІТ призначали пацієнтам із наявністю головних компонентів (висока ефективність) або головних і мінорних компонентів (середня ефективність). Зауважимо, що серед цих пацієнтів не було осіб лише з мінорними компонентами і, відповідно, – прогностично низькою ефективністю АСІТ. Пацієнти на АСІТ (при необхідності) отримували відповідну протоколам симптоматичну і базисну терапію.

Ефективність терапії визначалася за допомогою оцінки клінічних симптомів із використанням шкали ВАШ.

При оцінці клінічних симптомів у динаміці у пацієнтів з IgE-залежною формою АР було виявлено, що через 6 місяців після лікування спостерігали вірогідну різницю оцінки змін показників оцінки за шкалою ВАШ, таких як

ринорея, чихання, свербіж носа та закладеність носа. Через 12 місяців лікування вірогідні зміни спостерігаються з усіма симптомами: чихання, ринорея, свербіж носа, почервоніння та виділення з очей. Аналогічні зміни спостерігаються і при оцінці нижніх симптомів. Вірогідна різниця клінічних симптомів, таких як кашель і утруднене дихання, спостерігаються через 12 місяців після лікування.

При оцінці клінічних симптомів у динаміці у пацієнтів із IgE-незалежною формою АР було показано, що через 6 місяців вірогідних змін показників оцінки за шкалою ВАШ виявлено не було. Через 12 місяців лікування вірогідні зміни спостерігаються лише за симптомами чихання, свербіж носа, почервоніння та виділення з очей. Однак через 24 та 36 місяців після АСІТ оцінка цих показників практично не змінюється. Симптоми закладеності носа і ринореї зменшуються тільки через 24 місяці після лікування, і залишаються практично без змін після 36 місяців лікування. Аналогічні зміни спостерігаються і при оцінці нижніх симптомів. Вірогідна різниця клінічних симптомів, таких як кашель і утруднене дихання, спостерігається через 12 місяців після лікування та також не змінювалась до закінчення АСІТ.

Таким чином, на підставі виконаних досліджень, можна зробити висновок, що проведений трьохрічний курс АСІТ продемонстрував точність персоніфікованого вибору алерговакцини на підставі молекулярних досліджень і високу клінічну ефективність у пацієнтів з IgE-залежною формою АР, що підтверджувалось критеріями ВАШ. Тоді як у пацієнтів із IgE-незалежною формою АР ефективність АСІТ за шкалою ВШ була нижчою, про що свідчили показники оцінки нижніх та верхніх носових та неносових симптомів за шкалою ВАШ, які були значно вищими у порівнянні з пацієнтами IgE-залежною формою АР.

Метою наших подальших досліджень було на основі показників клітинного імунітету, зокрема оцінки рівня активності Т-регуляторних клітин та показників синтезу цитокінів, з'ясувати можливі механізми менш ефективного лікування у пацієнтів з IgE-незалежною формою АР.

Згідно із проведеними нами дослідженнями, було встановлено, що у групі осіб з IgE-залежною формою АР після проведення АСІТ встановлено тенденцію до зниження чисельності CD4+-лімфоцитів, у той же час кількість CD8+-лімфоцитів була підвищеною лише у відсоткових значеннях. Зміна співвідношення Т-лімфоцитів хелперів та Т-лімфоцитів супресорів/цитотоксичних відображена у підвищенні імунорегуляторного індексу CD4/CD8 порівняно із групою контрольних осіб. Щодо кількості CD19 В-лімфоцитів, то у групі осіб з IgE-залежною формою АР встановлено підвищення їх кількості в абсолютних і відносних значеннях. Число CD16+56 NK-лімфоцитів не змінювалось у порівнянні з групою осіб до лікування.

При оцінці аналогічних показників у групі осіб з IgE-незалежною формою АР вірогідних змін рівня числа клітин після проведення АСІТ виявлено не було. Встановлено тенденцію до зниження числа CD4+Т-лімфоцитів хелперів та підвищення рівня CD8+-лімфоцитів як у відносних, так і абсолютних значеннях. Вірогідних змін числа В-лімфоцитів і NK-лімфоцитів також виявлено не було.

При оцінці експресії активізаційних маркерів у групі осіб із IgE-залежною формою АР після проведеної АСІТ було встановлено зниження рівня активованих клітин, при оцінці експресії маркера CD69 на NK-лімфоцитах вірогідних змін рівня його експресії виявлено не було. При визначенні рівня експресії HLA-DR на лімфоцитах вірогідні зміни були виявлені лише у групі осіб з IgE-незалежною формою АР.

Добре відомо, що алергенспецифічні Treg клітини відіграють важливу роль в імунологічній індукції толерантності, що спостерігається під час АСІТ. Вони здатні пригнічувати активацію, проліферацію і ефektorні функції широкого спектру клітин-мішеней, включаючи вроджені клітини, антигенпрезентуючі клітини і ефektorні Т-клітини (в основному Th9 і Th17).

Регуляторні Т-клітини також вивільняють цитокіни, такі як IL-10 і TGF- $\beta$ , які мають ключову супресивну активність. Розрізняють дві субпопуляції регуляторних Т-клітин в залежності від їх походження: природні регуляторні

клітини, які походять з тимусу і є основною популяцією клітин для контролю ауто толерантності, і індуковані регуляторні Т-клітини, які генеруються із периферичних наївних CD4<sup>+</sup>-Т-лімфоцитів у відповідь на чужорідні антигени під час АСІТ. Ці субпопуляції Т-регуляторних клітин використовують різні механізми супресії: у той час як природні регуляторні Т-клітини переважно використовують контактні міжклітинні механізми взаємодії, супресія індукованими Т-регуляторними лімфоцитами здійснюється за допомогою імуномодулюючих цитокінів, таких як ІЛ-10 і TGF-β. Для регуляторних Т-клітин характерним є білок FoxP3, який є частиною транскрипційного фактора. Цей білок відіграє важливу роль в регуляції експресії генів, що беруть участь у багатьох процесах регуляторних Т-клітин.

За даними багатьох досліджень клінічний ефект АСІТ терапії пов'язаний із імунологічними змінами, такими як підвищення рівня sIgG4 блокуючих антитіл 31, що супроводжується пригніченням імунологічної відповіді Th2 – лімфоцитів за участю Tregs. За зміною рівня Tregs слідкували в динаміці.

Згідно із проведеними нами дослідженнями, у групі осіб ІgЕ-залежною формою АР підвищення кількості Tregs спостерігалось через 12 місяців після лікування та продовжувало підвищуватися, а через 36 місяців після лікування було вірогідно вищим у порівнянні з цим показником до лікування ( $p < 0,05$ ). У групі осіб із ІgЕ-незалежною формою АР підвищення кількості Treg клітин також спостерігалось через 12 місяців після лікування, однак, вірогідних змін його рівня впродовж подальшого лікування не спостерігалось.

Таким чином, у результаті проведеного дослідження було показано, що у групі осіб із ІgЕ-залежною формою АР після проведеної АСІТ спостерігається вірогідне підвищення кількості CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sub>low</sub> Т регуляторних лімфоцитів ( $p < 0,05$ ). У групі осіб із ІgЕ-незалежною формою АР кількість CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sub>low</sub> лімфоцитів вірогідно не змінювалась.

Враховуючи дані попередніх досліджень, нашою подальшою метою було встановити не лише кількісні зміни імунорегуляторних клітин, а й оцінити їх

функціональну активність за рівнем експресії цитокінів до та після застосуванні АСІТ. Для подальшого дослідження проводили оцінку синтезу цитокінів, які були репрезентативні для кожної клітинної субпопуляції. У результаті проведеного дослідження було встановлено, підвищення рівня ІЛ-2, ІFN $\gamma$  та зниження рівня ІЛ-3,4, ІЛ-13 у групі з осіб з ІgЕ-залежною формою АР. Тоді як у групі осіб з ІgЕ-незалежною формою АР рівень  $\gamma$ -ІFN не змінювався, виявлено підвищення ІЛ-2 та зниження ІЛ-5 та ІЛ-13. Однак вірогідних змін рівня цитокінів у досліджуваних групах виявлено не було.

Прийнято вважати, що Трег клітини відіграють ключову роль в індукції толерантності під час АСІТ. Однак існують суперечливі дані щодо ролі цих клітин. Як відомо, Трег клітини контролюють алергічне запалення шляхом синтезу цитокінів, таких як ІЛ-10 і TGF- $\beta$  27·50. У зв'язку з цим метою наших подальших досліджень було оцінити синтез ІЛ-10 і TGF- $\beta$  у групі з осіб з ІgЕ-залежною та ІgЕ-незалежною формою АР в динаміці лікування.

У результаті проведеного нам дослідження встановлено, що застосування АСІТ призвело до позитивного коригування синтезу цитокінів у пацієнтів з ІgЕ-залежною формою АР із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу. У результаті було показано, що АСІТ сприяє активації функції Трег клітин в обох дослідних групах, що проявлялось підвищенням синтезу TGF- $\beta$  через 6 місяців після лікування та ІЛ-10 через 12 місяців після лікування. У свою чергу підвищення синтезу цих цитокінів вплинуло і на переключення імунної відповіді в бік Th1 типу, що проявлялось посиленням продукції ІЛ-2 і ІFN- $\gamma$  та зниженням продукції ІЛ4, ІЛ5 і ІЛ13. Такі зміни були більш характерним для пацієнтів із ІgЕ-залежною формою АР, тоді як для пацієнтів з ІgЕ-незалежною формою характерним було лише незначне зниження рівня ІЛ-5 і ІЛ-13 та посилення продукції TGF- $\beta$ . Однак впродовж подальшого лікування змін рівня TGF- $\beta$  не спостерігали. Рівень ІЛ-10 також вірогідно не змінювався. Такі зміни можуть свідчити про різні патогенетичні механізми розвитку АР.

У подальшому нами були проведені *in vitro* дослідження стану імунітету у хворих із різними клінічними формами АР із вивченням функціональної активності клітин Т-хелперів I типу - за продукцією IL-2 і IFN- $\gamma$ ; Т-хелперів II типу - за продукцією IL-4, IL-5, IL-13; а також Тreg-лімфоцитів периферичної крові пацієнтів - за їх здатністю продукувати IL-10 і TGF- $\beta$  після проведення АСІТ. У результаті проведеного дослідження встановлено, що після проведеної АСІТ рівень продукції цитокінів Th1 типу IL-2 і IFN- $\gamma$  посилюються. При цьому в групі осіб з IgE-залежною формою АР зафіксовано посилення синтезу як типу IL-2, так і IFN- $\gamma$ , тоді як у групі з IgE-незалежною формою АР встановлено лише посилення синтезу IL-2. Відомо, що порушення синтезу IL-2 призводить до дефектів функціонування Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, натуральних кілерів. Покращення секреції IL-2 активованим антигеном мононуклеарами призводить до активації багатьох типів клітин, залучаючи їх у імунну відповідь. Щодо особливостей продукції цитокінів Th2 типу, то в результаті проведеного дослідження виявилось, що застосування АСІТ призвело до зниження мітогенактивованої продукції IL-4, IL-5, IL-13 у групі осіб з IgE-залежною АР і зниження мітогенактивованої продукції IL-5, IL-13 у групі осіб з IgE-незалежною формою АР. Отримані результати вказують на те, що після проведеної АСІТ при IgE-залежній формі АР потенціал клітин щодо синтезу IL-4 послаблюється, і, таким чином, рівень активації Th2 –лімфоцитів знижується шляхом підвищення синтезу IL-10 та TGF- $\beta$ , що в результаті може призвести і до зниження синтезу IgE. У даних групах хворих на АР спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції *in vitro* клітинами IL-10 лише через 12 місяців після проведення АСІТ, тоді як підвищення індукованої продукції TGF- $\beta$  клітинами *in vitro* встановлено вже через 6 місяців після лікування. У групі осіб з IgE-залежною формою АР рівні IL-10 та TGF- $\beta$  продовжували наростати впродовж лікування, а в групі осіб з IgE-незалежною формою вірогідних змін їх синтезу виявлено не було. Таким чином, у хворих IgE-залежною формою АР, на відміну від IgE-незалежної, спостерігалось достовірне підвищення показників спонтанної



та індукованої продукції IL-10 і TGF- $\beta$  клітинами *in vitro*, тоді як у хворих з IgE-незалежною формою АР встановлено підвищення рівня *in vitro* спонтанної й індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .

Отже, наше дослідження показало, що АСІТ індукує Treg-клітини, що веде до пригнічення алергічної імунної відповіді. Було показано, що переключення імунної відповіді під час АСІТ відбувається за рахунок пригнічення Th2-імунної відповіді за рахунок продукції Treg TGF- $\beta$  на ранніх етапах АСІТ та IL-10 на більш пізньому етапі. Таке пригнічення призводить до зниження рівня Th2 цитокінів (IL4, IL5, IL13), які приймають участь в інгібуванні Th1. Хоча Treg клітини з IL-10 опосередкованою супресивною дією представляють собою багатообіцяючу основу мішені для лікування алергії, однак необхідні подальші дослідження, які б підтвердили в подальшому потенційні біомаркери лікувальної ефективності і для інших видів АСІТ.

## ВИСНОВКИ

1. На підставі аналізу даних клінічних, лабораторних та молекулярних методів досліджень запропоновано алгоритм відбору пацієнтів з АР із сенсibilізацією до кліщів домашнього пилу для подальшого проведення алергенспецифічної імунотерапії. Перед проведенням АСИТ рекомендовано провести оцінку молекулярного профілю сенсibilізації до алергенів КДП. За даними проведеного дослідження основними сенсibilізуючими молекулами до КДП були Der p 2 і Der f 2. Сенсibilізації до алергенів Der p 5, Der p 21 та Der p 7 була встановлена у 28,45 – 22,57 % пацієнтів з алергією до кліщів домашнього пилу. Сенсibilізація до алергенів Der p 20 та Der p 10 зустрічалася – 8,14 % та 6,16 % обстежених осіб відповідно. Відтак, сенсibilізація до алергенів Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 20, Der p 21, Der p 23 повинна враховуватися при виборі тактик лікування хворих з алергією до КДП.
2. Визначено особливості клінічного перебігу захворювання у хворих з АР і сенсibilізацією до КДП. у 85 (75,9%) хворих були скарги на періодичне/постійне чихання, у 77 (68,7%) – на періодичну ринорею, у 84 (75,0%) – на закладеність носа, у 74 (66,1%) – на свербіж носа/очей, у 54 (48,2%) – на ринокон'юнктивіт, у 44 (39,3%) – на сухість шкірних покривів, у 29 (26,9%) – еритематозно-сквамозні висипання на шкірі верхніх кінцівок, верхньої частини грудної клітки, шиї тощо зі свербіжем, у 25 (22,3%) – на рецидивний бронхо-обструктивний синдром.
3. Досліджено динаміку змін імунофенотипових властивостей і складу мононуклеарних клітин периферичної крові у хворих з цілорічним АР і сенсibilізацією до КДП. Встановлено, що як у групі пацієнтів з IgE-залежною, так і IgE-незалежною формою АР спостерігаються системні порушення стану імунної системи, однак вірогідних змін рівня цих показників виявлено не було. У групі пацієнтів із IgE-залежною формою АР

окрім підвищеної кількості Т-лімфоцитів хелперів, зафіксовано зниження НК-клітин та вірогідне зниження кількості Т-регуляторних лімфоцитів.

4. Встановлено особливості змін функціональної активності мононуклеарних клітин периферичної крові за продукцією цитокінів в умовах *in vitro* ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13, ІЛ-10, а також ІFN- $\gamma$  і TGF- $\beta$  у хворих з цілорічним АР і сенсibiliзацією. Показано, що у хворих на ІgЕ-залежну форму АР спостерігається зниження продукції цитокінів (ІЛ-2, ІFN- $\gamma$ ) у периферичній крові, які продукуються Th1 лімфоцитами, та посилення продукції цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13), які продукуються Th2 лімфоцитами. Порушення дисбалансу між Th1/Th2 лімфоцитами супроводжувалось також зниженням продукції регуляторних цитокінів (ІЛ-10 та TGF- $\beta$ ). У групі хворих із ІgЕ-залежною формою АР спостерігається посилення спонтанної та індукованої продукції цитокінів лімфоїдними клітинами в умовах *in vitro*, що потенційно сприяє розвитку алергічного запалення та продукції ІgЕ. У групі хворих із ІgЕ-незалежною формою АР спостерігалась тенденція до посилення продукції Th2 цитокінів, однак вірогідних змін їх фонового рівня у периферичній крові виявлено не було. У хворих із ІgЕ-незалежною формою АР встановлено вірогідне підвищенням рівня *in vitro* спонтанної та індукованої продукції клітинами TGF- $\beta$ .
5. Встановлено, що після проведеної АСІТ рівень продукції цитокінів за умови *in vitro* в групі осіб з ІgЕ-залежною формою АР було зафіксовано посилення синтезу цитокінів Th1 типу (ІЛ-2, ІFN- $\gamma$ ), тоді як в групі із ІgЕ-незалежною формою АР було встановлено лише незначне посилення синтезу ІЛ-2. Рівень продукції клітинами за умови *in vitro* цитокінів Th2 типу (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-13) був вірогідно зниженим у групі осіб із ІgЕ-залежною АР в порівнянні з групою осіб з ІgЕ-незалежною формою АР. Після проведеної АСІТ при ІgЕ-залежній формі АР функціональна активність клітин *in vitro* щодо синтезу ІЛ-4 вірогідно послаблюється, і, таким чином, рівень

активації Th2 лімфоцитів знижується шляхом підвищення синтезу IL-10 та TGF- $\beta$ .

6. Доведено, що АСІТ сприяє підвищенню кількості та активації функції Treg клітин, що проявлялось підвищенням синтезу TGF- $\beta$  через 6 місяців та IL-10 через 12 місяців після лікування. Підвищення фонового рівня регуляторних цитокінів (IL-10 та TGF- $\beta$ ) у групі хворих на IgE-залежну форму АР вплинуло на переключення імунної відповіді в бік Th1 типу, що проявлялось посилення продукції IL-2 і IFN- $\gamma$ , та зниженням продукції IL4, IL5 і IL13. Для пацієнтів із IgE-незалежною формою було характерним незначне зниження фонового рівня IL-5 і IL-13 та посилення продукції TGF- $\beta$ .

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Рекомендовано стратифікувати підбір алергенспецифічної імунотерапії (АСІТ) в залежності від форми алергічного риніту. IgE-залежна форма риніту демонструє кращі результати АСІТ у пацієнтів з алергією до кліщів домашнього пилу, що підтверджується посиленням продукції цитокінів, що продукується Т-хелперами 1 типу та модулює імунну відповідь.
2. Доцільно визначати спектр сенсibiliзації до кліщів домашнього пилу як у пацієнтів з IgE-залежною та і IgE-незалежною формами алергічного риніту, особливо до Der p 5, Der p 7, Der p 10, Der p 20, Der p 21, Der p 23, котра має враховуватися при виборі тактик лікування хворих з алергією до кліщів домашнього пилу.
3. Можна застосовувати в якості біомаркерів ефективності проведеної АСІТ визначення прозапальних та протизапальних цитокінів у сироватці крові пацієнтів. Так як, у групі пацієнтів з IgE-залежною формою алергічного риніту доведено зниження рівня цитокінів Th2 типу (IL-4, IL-5, IL-13) та посилення синтезу цитокінів Th1 типу (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Тоді як біомаркерами ефективності АСІТ у групі пацієнтів з IgE-незалежною формою алергічного риніту можуть слугувати лише підвищення рівня цитокінів, що продукуються Т-регуляторними клітинами (IL-10 та TGF- $\beta$ ).
4. Рекомендовано пацієнтам з IgE-незалежною формою алергічного риніту та наявною сенсibiliзацією до мінорних компонентів кліща домашнього пилу (Der p10) не призначати АСІТ, котра не призводить до клінічного покращення.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аллахвердиева Л.И., Салим-заде Г.Э. Алгоритм отбора пациентов и мониторинг эффективности аллерген-специфической иммунотерапии. *Journal of Azerbaijan Allergy and Clinical Immunology, Scientific-practical journal* 2017; Vol. 5; № 2: 43-52.
2. Зубченко С.О., Маруняк С.Р. Оцінювання якості життя пацієнтів із пилковою алергією до та після курсу сублінгвальної імунотерапії. *Патологія.* 2018;2(43):201-215. Доступно на: <https://immunology.org.ua/index.php/journal/article/view/43>
3. Зубченко С., Чоп»як В., Колінковський О. та ін. Порівняльний аналіз альтернативних методів діагностики профілю сенсibiliзації пацієнтів Західного регіону України. *Імунологія та алергологія: наука і практика.* 2019; №3:5-57. Доступно на: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_3\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_3_7)
4. Маслова Л.В. Сублінгвальная иммунотерапия респираторной аллергии: иммунологическая эффективность. *Імунологія та алергологія: наука і практика.* 2013; №2:2-11. <https://doi.org/10.37321/immunology.2020.3-4-08>
5. Статистичний аналіз даних вимірювань: навч. посіб. / Єременко В.С., Куц Ю.В., Мокійчук В.М., Самойліченко О.В. – К.: НАУ, 2013.– 320 с. ISBN 978-966. Доступно на: [https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/44902/1/statistical\\_analysis.pdf](https://ela.kpi.ua/bitstream/123456789/44902/1/statistical_analysis.pdf)
6. ALLERGEN NOMENCLATURE WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. <http://allergen.org>
7. Akdis CA, Akdis M: Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol* 2011, 127(1):18-27, quiz 28-9.
8. Arlian L.G., Platts-Mills T.A. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol* 2001, Vol. 107 (3 Suppl). – P. 406-413; DOI: 10.1067/mai.2001.113670

9. Asam C., Hofer H., Wolf M., Aglas L., Wallner M. Tree pollen allergens an update from a molecular perspective. *Allergy*. 2015; 70(10):1201-1211; DOI: 10.1111/all.12696
10. Asokanathan N, Graham P.T, Stewart D.J. et al. House dust mite allergens induce proinflammatory cytokines from respiratory epithelial cells: the cysteine protease allergen, Der p 1, activates protease-activated receptor (PAR)-2 and inactivates PAR-1. *J Immunol* 2002; 15,169(8):4572-4578; DOI.org/10.4049/jimmunol.169.8.4572
11. Asturias J.A., Arilla M.C., GomezBayon N.N., Martinez A., Martinez J., Palacios R. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1998; Vol. 1397. – P. 27-30; DOI: 10.1016/s0167-4781(98)00006-2
12. Bae J.M., Choi Y.Y., Park C.O., Chung K.Y., Lee K.H. Efficacy of allergen-specific immunotherapy for atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013;132(1):110-117.; DOI.org/10.1016/j.jaci.2013.02.044
13. Bambang Suprayogi Resi Utomo, Mochammad Hatta , Robert H. Sirait The role of cytokine interleukin-2, transcription factor of FoxP3 in the immunological regulation of allergic rhinitis. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery* 2018; 7: 7-19. DOI:10.4236/ijohns.2018.71002
14. Bart N. Lambrecht, Hamida Hammad. Allergens and the airway epithelium response: Gateway to allergic sensitization. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*.-2014.-134.-P.499-507; DOI: 10.1016/j.jaci.2014.06.036
15. Bayrak P. Degirmenci, Aksun S., Altin Z., Bilgir F. et al. Allergic Rhinitis and Its Relationship with IL-10, IL-17, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL 22, and IL-35. *Hindawi Disease Markers* 2018; P.1-6. DOI: 10.1155/2018/9131432
16. Bousquet J., Heinzerling L., Bachert C. Practical Guide To Skin Prick Tests In Allergy To Aeroallergens. *Allergy*. 2012;67(1):18-24. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02728.x.

17. Bousquet J., Khaltaev N., Cruz A. A., et al. Allergic rhinitis and its impact on asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA2LEN and AllerGen). *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2008;63(86):8–160. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x.
18. Bousquet J. et al. 2019 ARIA Care pathways for allergen immunotherapy *Allergy*. 2019;74:2087–2102. DOI: 10.1111/all.13805
19. Bratke K, Haupt F, Kuepper M, Bade B, Faehndrich S, Luttmann W, Virchow JC Jr. Decrease of cytotoxic T cells in allergic asthma correlates with total serum immunoglobulin E. *Allergy* 2006; 61:1351–1357. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01192.x
20. Braunstahl GJ, Hellings PW. Nasobronchial interaction mechanisms in allergic airways disease. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head. Neck Surg* 2006; 14.-P.176–182. DOI.org/10.1097/01.moo.0000193186.15440.39
21. Borsutzky S et al: TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses. *J Immunol* 2004, 173(5):3305-9. DOI: 10.4049/jimmunol.173.5.3305
22. Calderón MA, Linneberg A, Kleine-Tebbe J, De Blay F, De Rojas DHF, Virchow JC, et al. Respiratory allergy caused by house dust mites: what do we really know? *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 136:38–48. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.10.012
23. Canonica G.W, Ansotegui I.J., Pawankar R., Schmid-Grendelmeier P., Marianne van Hage, Baena-Cagnani C., Melioli G., Nunes C., Passalacqua G. A WAO-ARIA-GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ. J* 2013;6:13. DOI: 10.1186/1939-4551-6-17.
24. Canonica G. W., Linda Cox, Ruby Pawankar, Carlos E Baena-Cagnani, Michael Blaiss, Sergio Bonini et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. *World Allergy Organ J*. 2014; Mar 28;7(1):6. DOI: 10.1186/1939-4551-7-6.
25. Chen W, et al: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4 +CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003, 198(12):1875-86. DOI: 10.1084/jem.20030152



26. Choi J.S., Ryu H.R., Yoon C.H., Kim J.H., Baek J.O., Roh J.Y. et al. Treatment of patients with refractory atopic dermatitis sensitized to house dust mites by using sublingual allergen immunotherapy. *Ann. Dermatol.* 2015;27(1):82-86. DOI: 10.5021/ad.2015.27.1.82.
27. Cosme-Blanco W et al Anaphylaxis to Horses and Epinephrine Use: Increasing Awareness Among Pediatric Patients and Families. *Pediatr Allergy Immunol* 2017;28(6):608-610. DOI: 10.1111/pai.12753.
28. Cosme-Blanco W., Chew, F. The major allergen Der p 2 is a cholesterol binding protein. *Sci Rep* 9, 1556 (2019). <https://DOI.org/10.1038/s41598-018-38313-9>
29. Curin M, Huang HJ, Garmatiuk T, Gutfreund S, Resch-Marat Y, Chen KW et. al.. IgE Epitopes of the House Dust Mite Allergen Der p 7 Are Mainly Discontinuous and Conformational. *Front Immunol.* 2021; Jun 15;12:687294. DOI: 10.3389/fimmu.2021.687294
30. Dabbaghzadeh A, Ghaffari J, Feridoni M, Alipour A. House Dust Mite Allergen Levels of Der p1 and Der f1 in Houses of Asthmatic Children. *J. Pediatr. Rev.* 2020; 8 (4) :267-274; URL: <http://jpr.mazums.ac.ir/article-1-299-en.html>
31. D'Amato G., Cecchi L., Bonini S., Nunes C., Annesi-Maesano I., Behrendt H. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy.* 2007;62(9):976-990. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2007.01393.x
32. De Schryver E, Devuyst L, Derycke L, Dullaers M, Van Zele T, Bachert C, Gevaert P. Local immunoglobulin e in the nasal mucosa: clinical implications / De Schryver E, Devuyst L, Derycke L, Dullaers M, Van Zele T, Bachert C, Gevaert P. *Allergy Asthma Immunol Res* 2015; 7:321–331. DOI: 10.4168/aair.2015.7.4.321
33. Denburg J.A. The origins of basophils and eosinophils in allergic inflammation / Denburg JA // *J. Allergy. Clin. Immunol* 1998; 102:74–76. <https://www.jacionline.org/action/showPdf?pii=S0091-6749%2898%2970034-X>
34. Depner M, Ege MJ, Genuneit J, Pekkanen J, Roponen M, Hirvonen M-R, et al: Atopic sensitization in the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:781-788. DOI: 10.1016/j.jaci.2012.11.048

35. Dzoro S, Mittermann I, Resch-Marat Y, et al. House dust mites as potential carriers for IgE sensitization to bacterial antigens. *Allergy*.2018;73(1):115-124. DOI: 10.1111/all.13260.
36. EAACI Molecular Allergology User's Guide // P M Matricardi , J Kleine-Tebbe , H J Hoffmann et al, 2016. -381p.
37. Fan D, Wang X, Wang M, Wang Y, Zhang L, Li Y, Fan E, Cao F, Van Crombruggen K, Zhang L. Allergen-dependent differences in ILC2s frequencies in patients with allergic rhinitis. *Allergy Asthma Immunol Res* 2016; 8:216–222. DOI: 10.4168/aair.2016.8.3.216
38. Fernandez, T. D. et al. Differential Plasma-cell evolution is linked with *Dermatophagoides pteronyssinus* immunotherapy response. *Sci Rep* 5, 14482, DOI:srep14482 [pii]10.1038/srep14482 (2015).
39. Fujita et al. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy* 2012, 2:2. DOI: 10.1186/2045-7022-2-2
40. Fujimoto M: Regulatory B cells in skin and connective tissue diseases. *J Dermatol Sci* 2010, 60(1):1-7. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2010.08.010.
41. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. The development of allergic inflammation. *Nature* 2008; Galli SJ, Mindy Tsai 454.-P.445–454. DOI: 10.1038/nature07204
42. Galli SJ, Mindy Tsai. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med*. 2008; 18(5): 693–704. DOI: 10.1038/nm.2755.
43. Gafvelin G., Johansson E., Lundin A. et al. Cross-reactivity studies of a new group 2 allergen from the dust mite *Glycyphagus domesticus*, Gly d 2, and group 2 allergens from *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lepidoglyphus destructor*, and *Tyrophagus putrescentiae* with recombinant allergens. *J. Allergy Clin. Immunol* 2001; Vol. 107 (3). – P. 511-518. DOI: 10.1067/mai.2001.112264
44. Gamez C., Sanchez-Garc a S., Ib ez M.D., L pez R., Aguado E., L pez E., Sastre B., Sastre J., Del Pozo V. Tropomyosin IgE-positive results are a good predictor of shrimp allergy. *Allergy* 2011; Vol. 66 (10), P. 1375-1383. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2011.02663.x.

45. Gardner, L. M., Tien, F. C., Douglass, J. A., Rolland, J. M. & O’Hehir, R. E. Induction of T ‘regulatory’ cells by standardized house dust mite immunotherapy: an increase in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> interleukin-10<sup>+</sup> T cells expressing peripheral tissue trafficking markers. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* 2004; 34, 1209–1219. DOI: [10.1111/j.1365-2222.2004.02009.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.02009.x) CEA2009
46. Gérard Eberl, Marco Colonna, James P. Di Santo, and Andrew N.J. McKenzie. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. *Science* 2015; 22; 348:6237. DOI: [10.1126/science.aaa6566](https://doi.org/10.1126/science.aaa6566)
47. Global strategy for asthma management and prevention.-2017.-159 p. <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/06/GINA-2019-main-report-June-2019-wms.pdf>
48. Gołebiewska-Wawrzyniak M, Markiewicz K, Rytwiński K, et al. CD69 and PCNA expression of T-lymphocytes from children with cow's milk allergy (CMA). *Med Wieku Rozwoj* 2003; 7(4Pt2):565-575. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15213371>
49. Gongales M., Dona I. et al. Dermatophagoides pteronyssinus immunotherapy changes the T-regulatory cell activity. *Sci Rep* 2017; 7, 11949. DOI: [10.1038/s41598-017-12261-2](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12261-2)
50. Gomez, E. et al. Initial immunological changes as predictors for house dust mite immunotherapy response. *Clin Exp Allergy* 45, 1542–1553, [https://DOI.org/10.1111/cea.12578](https://doi.org/10.1111/cea.12578) (2015). DOI: [10.1111/cea.12578](https://doi.org/10.1111/cea.12578)
51. González-Pérez R, Pineda F, Poza-Guedes P. et al. Molecular allergen profiling of dual mite sensitization in severe allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2020; Vol. 30(6): 2-20. DOI: [10.18176/jiaci.0439](https://doi.org/10.18176/jiaci.0439)
52. Gri G, et al: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity* 2008, 29(5):771-81. DOI: [10.1016/j.immuni.2008.08.018](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.018)

53. Gu Z.W., Wang Y.X., Cao Z.W. Neutralization of interleukin-17 suppresses allergic rhinitis symptoms by downregulating Th2 and Th17 responses and upregulating the Treg response *Oncotarget*. 2017;8:22361–9. DOI: 10.18632/oncotarget.15652
54. Hales B.J., Shen H.D, Thomas W.R. Crossreactivity of T-cell responses to *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. Studies with group 1 and 7 allergens. *Clin. Exp. Allergy* 2000; Vol. 30 (7):927-933. DOI: 10.1046/j.1365-2222.2000.00900.x.
55. Hamilton RG. Clinical laboratories worldwide need to report IgE antibody results on clinical specimens as analytical results and not use differential positive thresholds. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:811-2. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.03.002.
56. Han D, et al: Allergen-specific IL-10-secreting type I T regulatory cells, but not CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells, are decreased in peripheral blood of patients with persistent allergic rhinitis. *Clin Immunol* 2010, 136(2):292-30. DOI: 10.1016/j.clim.2010.03.006.
57. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, Montagni M, Canonica GW, Melioli G. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organ J*. 2018;11:7. DOI: 10.1186/s40413-018-0186-3
58. Henriques A, Nunes R, Loureiro Pereira GMartinho A, Pais M, Segorbe-Luis A, Trindade H, C, Paiva A. Alterations on peripheral blood B cell subsets induced by allergic rhinitis. *Inflamm Res* 2015; 64:145–149. DOI: 10.1007/s00011-015-0803-3.
59. Hiroyuki Fujita, Michael B Soyka, Mübeccel Akdis, Cezmi A Akdis Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy* 2012, 2:2 DOI:10.1186/2045-7022-2-2
60. Huang X, Chen Y, Zhang F, Yang Q, Zhang G. Peripheral Th17/Treg cell-mediated immunity imbalance in allergic rhinitis patients / Huang X, Chen Y, Zhang F, Yang Q, Zhang G. *Peripheral. Braz J Otorhinolaryngol* 2014; 80:152–5. DOI: 10.5935/1808-8694.20140031

61. Ignacio J. Ansotegui, Giovanni Melioli, Giorgio Walter Canonica A WAO—ARIA—GA2LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. *World Allergy Organization Journal* 2020; 1-467. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100091.
62. J. De Alba, K. Raemdonck, A. Dekkack. House dust mite induces direct airway inflammation in vivo: implications for future disease therapy? *Eur Respir J.* 2010; 35.-P.1377–1387. DOI: 10.1183/09031936.00022908
63. Jacquet A. Innate immune responses in house dust mite allergy. *ISRN allergy* 2013. Feb 28;2013:735031. DOI: 10.1155/2013/7350313
64. James T.L., Nelson N., Lockey R., Cox L. et al., Mechanisms of immunotherapy In: Allergen immunotherapy: A practical parameter second update. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2007;120(3):38. DOI.org/10.1016/j.jaci.2007.06.019
65. Jutel, M., Akdis, M., Blaser, K. & Akdis, C. A. Mechanisms of allergen specific immunotherapy—T-cell tolerance and more. *Allergy* 61, 796–807, DOI:ALL1175 (2006). DOI: 10.1111/j.1398-9995.2006.01175.x
66. Kappen, J. H., Durham, S. R., Veen, H. I. & Shamji, M. H. Applications and mechanisms of immunotherapy in allergic rhinitis and asthma. *Ther Adv Respir Dis* 2017 Jan;11(1):73-86. doi: 10.1177/1753465816669662.
67. Kauffman H.F., Tamm M., Timmerman J.A.B., Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clinical and Molecular Allergy*. 2006. vol. 4. no. 1. P. 5. DOI: [10.1186/1476-7961-4-5](https://doi.org/10.1186/1476-7961-4-5)
68. King C., Brennan S., Thompson P.J., Stewart G.A. Dust mite proteolytic allergens induce cytokine release from cultured airway epithelium *J. Immunol* 1998; Vol. 161:3645-3651. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9759888/>
69. Kim JH, Gong CH, Choi GE, Kim SA, Kim HS, Jang YJ. Natural killer cell deficits aggravate allergic rhinosinusitis in a murine model. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat Spec* 2016; 78:199–207; DOI:10.1186/1476-7961-4-5.18

70. Kirmaz C, Ozenturk Kirgiz O, Bayrak P, Yilmaz O, Vatansever S, Ozbilgin K, Onur E, Celik O, Sogut A, Ay G, Yuksel H. Effects of allergen-specific immunotherapy on functions of helper and regulatory T cells in patients with seasonal allergic rhinitis. *Eur Cytokine Netw* 2011; 22:15–23. DOI:10.1684/ecn.2011.0277
71. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine* 2012; 18:684–692. DOI: 10.1038/nm.2737.
72. Ludger Klimek, Karl-Christian Bergmann, Tilo Biedermann, Jean Bousquet, Peter Hellings, Kirsten Jung et al. Visual analogue scales (VAS): Measuring instruments for the documentation of symptoms and therapy monitoring in cases of allergic rhinitis in everyday health care. *Allergo J Int.* 2017;26(1):16-24. DOI: 10.1007/s40629-016-0006-7
73. Leon B, Ballesteros-Tato A, Lund FE. Dendritic cells and B cells: unexpected partners in Th2 development. *J Immunol* 2014; 193.-1531–1537. DOI: 10.4049/jimmunol.1400149
74. Lockey RF. The importance of knowing how allergen extracts are manufactured. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2017;118:2-3. DOI: 10.1016/j.anai.2016.03.032
75. Lopata A.L., Lehrer S. New insights into seafood allergy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol* 2009, Vol. 9:270-277. DOI: 10.1097/ACI.0b013e32832b3e6f.
76. Ludger Klimek, Karl-Christian Bergmann, Tilo Biedermann, Jean Bousquet, Peter Hellings, Kirsten Jung et al. Visual analogue scales (VAS): Measuring instruments for the documentation of symptoms and therapy monitoring in cases of allergic rhinitis in everyday health care. *Allergo J Int.* 2017;26(1):16-24. DOI: 10.1007/s40629-016-0006-7
77. Magali Noval Rivas, Talal A. Chatila Regulatory T cells in Allergic Diseases. *J Allergy Clin Immunol.*-2016.-138(3).-P.639–652; DOI.org/10.1016/j.jaci.2016.06.003
78. Martín-Orozco E., Norte-Muñoz V.? Martínez-García J. Regulatory T Cells in Allergy and Asthma. *Front. Pediatr.* 2017.-5:117; DOI: 10.3389/fped.2017.00117

79. Matricardi P. M. EAACI Molecular Allergology User's Guid. *Pediatric Allergy and Immunology* 2016; 27, (suppl23): 1–250.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27288833/>
80. Miller JD. The role of dust mites in allergy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2018.  
<https://doi.org/10.1007/s12016-018-8693-0>
81. Meiler F, et al: Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy* 2008, 63(11):1455-63. DOI.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01774.x
82. Moed, H., Gerth van Wijk, R., Hendriks, R. W. & van der Wouden, J. C. Evaluation of clinical and immunological responses: a 2-year follow-up study in children with allergic rhinitis due to house dust mite. *Mediators of inflammation* 2013, 345217, <https://doi.org/10.1155/2013/345217> (2013).
83. Mozafar Mohammadi Nejad, Eisa Salehi, Mehrnaz Mesdaghi et al. Increased Expression of CD69 Antigen on Human Peripheral Blood Natural Killer Cells in Patients with Allergic Rhinitis Iran. *J Allergy Asthma Immunol* 2013; 12(1):68-74.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23454781>
84. Muddaluru V, Valenta R, Vrtala S, Schleederer T, Hindley J, Hickey P. et. al. Comparison of house dust mite sensitization profiles in allergic adults from Canada, Europe, South Africa and USA. *Allergy.* 2021 Jul;76(7):2177-2188. DOI: 10.1111/all.14749.
85. Mueller G. A., Edwards L.L., Aloor J.J., Fessler M.B., Glesner J., Pomés A., Chapman M.D., London R.E., Pedersen L.C. The structure of the dust mite allergen Der p 7 reveals similarities to innate immune proteins. *J. Allergy Clin. Immunol* 2010, Vol. 125 (4): 909-917.
86. Mozafar Mohammadi Nejad, Eisa Salehi, Mehrnaz Mesdaghi et al. Increased Expression of CD69 Antigen on Human Peripheral Blood Natural Killer Cells in Patients with Allergic Rhinitis. *J Allergy Asthma Immunol* 2013; 12(1).-P.68-74.
87. Mueller G.A., Gosavi R.A., Krahn J.M., Edwards L.L., Cuneo M.J., Glesner J., Pomés A., Chapman M.D., London R.E., Pedersen L.C. Der p 5 crystal structure

- provides insight into the group 5 dust mite allergens. *Journal of Biological Chemistry* 2010; vol. 285, 33: 25394–25401. DOI: 10.1074/jbc.M110.12830617
88. Novak N., Bieber T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:252-62. DOI: 10.1067/mai.2003.1595
89. Palomares O, et al: Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010; 40(5):1232-40. DOI: 10.1002/eji.200940045
90. Pang, S.L., Matta, S.A., Sio, Y.Y. et al. IgE-binding residues analysis of the house dust mite allergen Der p 23. *Sci Rep* 2021; 11, 921. <https://DOI.org/10.1038/s41598-020-79820-y>
91. Panzner P., Vachová M., Vítovcová P., Brodská P., Vlas T. A Comprehensive Analysis of Middle-European Molecular Sensitization Profiles to Pollen Allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2014; 164:74-82. DOI: 10.1159/000362760
92. Pascal Demoly, Catherine Bos, Carmen Vidal. Worsening of chronic house-dust-mite-induced respiratory allergies: An observational survey in three European countries *Open Access Published: July 06, 2021* DOI:<https://doi.org/10.1016/j.waojou.2021.100563>
93. Paul-Dauphin A, Guillemin F, Virion J M, Briançon S. Bias. Precision in Visual Analogue Scales: A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Epidemiology* 1999;150(10):1117-1127 DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a009937
94. Pawankar R, Ra C. Heterogeneity of mast cells and T cells in the nasal mucosa. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98:248–262; DOI.org/10.1016/S0091-6749(96)70073-8
95. Pawankar R., Mori S., Kimura S. Overview of the pathomechanisms of allergic rhinitis. *Asia Pac Allergy* 2011;1(3):157-167. DOI: 10.5415/apallergy.2011.1.3.157
96. Peake H.L., Currie A.J., Stewart G.A, McWilliam A.S. Nitric oxide production by alveolar macrophages in response to house dust mite fecal pellets and the mite allergens, Der p 1 and Der p 2. *J. Allergy Clin. Immunol* 2003; Vol. 112 (3) 531-537. DOI: 10.1016/s0091-6749(03)01626-9
97. Pichavant M, Charbonnier AS, Taront S, Briche A, Wallaert B, Pestel J, et al. Asthmatic bronchialepithelium activated by the proteolytic allergen Der p 1 increases



- selectivedendritic cell recruitment. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:771–778. DOI: 10.1016/j.jaci.2004.11.043
98. Pichler U., Hauser M., Wolf M. Pectate Lyase Pollen Allergens: Sensitization Profiles and Cross-reactivity Pattern. *PLoS One*. 2015;10:1-19. DOI.org/10.1371/journal.pone.0120038
99. Pilar Martín, Manuel Gómez, Amalia Lamana, Adela Matesanz Marín, José R Cortés The Leukocyte Activation Antigen CD69 Limits Allergic Asthma and Skin Contact Hypersensitivity // *J Allergy Clin Immunol*-. 2010.-126(2).-P.355-365. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.05.010.
100. Poole JA, Rosenwasser LJ. The role of immunoglobulin E and immune inflammation: implications in allergic rhinitis. *Curr Allergy Asthma Rep*-. 2005;5:252–258. DOI: 10.1007/s11882-005-0045-5
101. Posa D, Hofmaier S, Arasi S, Matricardi PM. Natural evolution of IgE responses to mite allergens and relationship to progression of allergic disease: a review. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2017;17(5):28. DOI: 10.1007/s11882-017-0697-y
102. Posa D et al. Evolution and predictive value of IgE responses toward a comprehensive panel of house dust mite allergens during the first 2 decades of life. *J Allergy Clin Immunol* 2017;139:541-549. DOI: 10.1007/s11882-017-0697-y
103. Qiu S, Du Y, Duan X, Geng X, Xie J, Gao H, Yang PC. Cytotoxic T lymphocytes mediate chronic inflammation of the nasal mucosa of patients with atypical allergic rhinitis. *N. Am. J Med Sci* 2011; 3:378–383. DOI: 10.4297/najms.2011.3378.
104. Scala E, Palazzo P. et al. IgE recognition patterns of profilin, PR-10, and tropomyosin panallergens tested in 3,113 allergic patients by allergen microarray-based technology. *PLoS One* 2011; Vol.6(9). e24912. DOI: 10.1371/journal.pone.0024912.
105. Scanlon S.T., Andrew NJ McKenzie. Type 2 innate lymphoid cells new players in asthma and allergy. *Current Opinion in Immunology* 2012 Dec;24(6):707-12. DOI: 10.1016/j.coi.2012.08.009

106. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203:1693–1700. DOI: 10.1084/jem.20060468
107. Sidenius K.E., Hallas T.E., Poulsen L.K., Mosbech H. Allergen cross-reactivity between house-dust mites and other invertebrates . *Allergy* 2001; Vol. 56 (8):723-33. DOI: 10.1034/j.1398-9995.2001.056008723.x.
108. Skrindo I, Scheel C, Johansen FE, Jahnsen FL. Experimentally induced accumulation of Foxp3(+) T cells in upper airway allergy. *Clin Exp Allergy*.-2011.-41:954–962. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03710.x.
109. Sun R., Yang Y., Huq Q. et all. Increased expression of type 2 innate lymphoid cells in pediatric patients with allergic rhinitis. *Exp.Ther. Med* 2020; 19(1):735-740. DOI: 10.3892/etm.2019.8235
110. Raulf M., Bergmann K. C., Kull S., Sander I., Hilger C., Brüning T., Jappe U., Müsken H., Sperl A., Vrtala S., Zahradnik E., Klimek L. Mites and other indoor allergens – from exposure to sensitization and treatment. *Allergo journal international*. 2015; vol. 24: 68–80. DOI: 10.1007/s40629-015-0049-12
111. Resch Y et al. Different IgE recognition of mite allergen components in asthmatic and non asthmatic children. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2015;136(4):1083- 91. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.03.024.
112. Riccio AM, De Ferrari L, Chiappori A, et al. Molecular diagnosis and precision medicine in allergy management. *Clin Chem Lab Med*. 2016;54:1705–1714. DOI: 10.1515/cclm-2016-0007.
113. Rodríguez-Domínguez A, Berings M, Rohrbach A, et al. Molecular profiling of allergen-specific antibody responses may enhance success of specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;146(5):1097-1108. DOI:10.1016/j.jaci.2020.03.029)
114. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines /

- Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. *Immunity* 1995; 2:271–279. DOI: 10.1016/1074-7613(95)90051-9.
115. Scanlon ST, McKenzie AN. The messenger between worlds: the regulation of innate and adaptive type-2 immunity by innate lymphoid cells. *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 9–20; DOI: 10.1111/cea.12464.
116. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptor discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1693–1700.
117. Schroeder HW Jr, Cavacini L: Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(2 Suppl 2):S41-52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
118. Skrindo I, Scheel C, Johansen FE, Jahnsen FL. Experimentally induced accumulation of Foxp3(+) T cells in upper airway allergy / Skrindo I, Scheel C, Johansen FE, Jahnsen FL. *Clin Exp Allergy* 2011; 41:954–962. DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03710.x.
119. Smith A.M., Benjamin D.C., Hozic N., Derewenda U., Smith W.A, Thomas W.R, Gafvelin G., van Hage-Hamsten M., Chapman M.D. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J. Allergy Clin. Immunol* 2001; Vol. 107 (6):977-84. DOI: 10.1067/mai.2001.115629.
120. Spits H, Cupedo T. Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. *Annual Review of Immunology* 2012; 30:647–675. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075053.
121. Stephen J Galli, Mindy Tsai. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat Med* 2012 ; 18(5): 693–704. DOI: 10.1038/nm.2755.
122. Stranzl T, Ipsen H, Christensen LH, et al. Limited impact of Der p 23 IgE on treatment outcomes in tablet allergy immunotherapy phase III study. *Allergy*. 2021;76(4):1235-1238. DOI:10.1111/all.14200

123. Soares-Weiser K, Takwoingi Y, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Hoffmann-Sommergruber K, et al: The diagnosis of food allergy: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* 2014;69:76-86. DOI: 10.1111/all.12333.
124. Sogut A, Yilmaz O, Kirmaz C, Ozbilgin K, Onur E, Celik O, Pinar E, VatanseverS, Dinc G, Yuksel H. Regulatory-T, T-helper 1, and T-helper 2 cell differentiation in nasal mucosa of allergic rhinitis with olive pollen sensitivity . *Int. Arch. Allergy. Immunol* 2012; 157:349–353; DOI: 10.1159/000329159.
125. Sun R., Yang Y., Huq Q. et all. Increased expression of type 2 innate lymphoid cells in pediatric patients with allergic rhinitis. *Exp.Ther. Med* 2020; 19(1):735-740; DOI: 10.3892/etm.2019.8235.
126. Takai T, Kato T, Sakata Y,et al. Recombinant Der p 1 and Der f1 exhibit cysteine protease activity but no serine protease activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 944–952; DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.01.051.
127. Tang J, Xiao P, Luo X, Bai J, Xia W, Chen W, Li J, Yu Q, Shi S, Xu Y, et al. Increased IL-22 level in allergic rhinitis significantly correlates with clinical severity. *Am J Rhinol Allergy* 2014; 28:197–2014-6. DOI: 10.2500/ajra.2014.28.4088.
128. Thomas W.R., Hales B.J., Smith W.A. House dust mite allergens in asthma and allergy. *Trends in molecular medicine* 2010; vol. 16. no. 7: 321–328. DOI: 10.1016/j.molmed.2010.04.00822
129. Thomas W.R, Smith W.A., Hales B.J. The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang. Gung. Med. J* 2004; Vol. 27 (8): 563- 569. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15553602/>
130. Thomas W.R., Smith W. House-dust mite allergens. *Allergy* 1998; Vol. 53: 821-832. DOI: 10.1111/j.1398-9995.1998.tb03987.x.
131. WAO - ARIA - GA<sup>2</sup>LEN consensus document on molecular-based allergy diagnosis (PAMD@): Update 2020. DOI: 10.1016/j.waojou.2019.100091.

132. Wachholz PA, Durham SR: Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4(4):313-8. DOI: 10.1097/01.all.0000136753.35948.c0.
133. Wang X.Q., Hu G.H., Kang H.Y., Shen Y., Ke X., Hong S.L. High frequency of T helper type 9 cells in Chinese patients with allergic rhinitis. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2015; 33:301–307; DOI: 10.12932/AP0609.33.4.2015.
134. Willart MAM, Lambrecht BN. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2009; 39(1):12–19; 129. Willart MAM, Lambrecht BN. The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma. *Clinical and Experimental Allergy* 2009; 39(1):12–19;
135. Wong KJ, Timbrell V, Xi Y, Upham JW, Collins AM, Davies JM. IgE+ B cells are scarce, but allergen-specific B cells with a memory phenotype circulate in patients with allergic rhinitis. *Allergy* 2015; 70:420–428. DOI: 10.1111/all.12563.
136. Varshney J., Varshney H. Allergic Rhinitis: an Overview. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg* 2015; 67(2):143–149; DOI 10.1007/s12070-015-0828-5
137. Vrtala S. From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy* 2008; Vol. 63:299-309. oi: 10.1111/j.1398-9995.2007.01609.x.
138. Yang L, Zhu R. Immunotherapy of house dust mite allergy. *Hum Vaccin Immunother* 2017; Oct3; 13(10):2390-2396. DOI: 10.1080/21645515.2017.1364823.
139. Yong Hyun Jang, Jin Kyeong Choi, Meiling Jin et all. House Dust Mite Increases pro-Th2 Cytokines IL-25 and IL-33 via the Activation of TLR1/6 Signaling. *Journal of Investigative Dermatology* 2017; 137,2354e2361; DOI: 10.1016/j.jid.2017.03.042.
140. Zhang H, Cardell LO, Bjorkander J, Benson M, Wang H. Comprehensive profiling of peripheral immune cells and subsets in patients with intermittent allergic rhinitis compared to healthy controls and after treatment with glucocorticoids. *Inflammatio* 2013; 36:821–829; DOI: 10.1007/s10753-013-9608-0.

141. Zidarn M, Robič M, Krivec A, et al. Clinical and immunological differences between asymptomatic HDM-sensitized and HDM-allergic rhinitis patients. *Clin Exp Allergy* 2019;49(6):808-818. DOI:10.1111/cea.13361
142. Zidarn M, Robič M, Krivec A, et al. Clinical and immunological differences between asymptomatic HDM-sensitized and KHDM-allergic rhinitis patients. *Clin Exp Allergy*. 2019;49(6):808-818. DOI: 10.1111/cea.13361.
143. Zhou J, et al: CD8+ gammadelta T regulatory cells mediate kidney allograft prolongation after oral exposure to alloantigen. *Transpl Int* 2008, 21(7):679-87. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2008.00669.x.
144. Zock J.P., Heinrich J., Jarvis D., et al. Indoor Working Group of the European Community Respiratory Health Survey II. Distribution and determinants of house dust mite allergens in Europe: The European Community Respiratory Health Survey II. *J. Allergy Clin. Immunol* 2006; Vol. 118, N 3: 682-690. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.04.060
145. Zubchenko S., Maruniak S., Sharikadze O. Allergen component testing – a new era in diagnostics of patients with pollen allergy. *Wiadomosci Lekarskie*. 2019;3(72):391-394. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31050986/>
146. Zubchenko S. Features of the molecular profile of allergic patients – residents of Lviv and Lvivskyj region. *NTSN MS*. 2018;2:60-66. DOI 10.25040/ntsh2018.02.060
147. Zubchenko SO, Yurjev SD, Marunyak SR. Molecular allergodiagnosics as a method of differential approach to the choice of allergeoimmunotherapy for allergy to pets. *Science and Education a new Dimension Natural and Technical Sciences*. 2016; 4(10- Iss 91):21-29.

## ДОДАТКИ

### ДОДАДОК 1

#### Список публікацій здобувача

1. Yuriev, S. (2020). Assessment of the cytokine profile in patients with allergic rhinitis caused by sensitization to house dust mite. *Immunology and Allergy: Science and Practice*, (1), 25-31. <https://doi.org/10.37321/immunology.2020.01-04>
2. Marushko, I., Halushko, B., Yuriev, S., Nyshchak, T., & Moskovento, E. (2021). CLINICAL SIGNIFICANCE OF IgG ANTIBODIES IN THE DIAGNOSIS OF ALLERGIC CONDITIONS AND CONTROL OF ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY. Review. *Medical Science of Ukraine (MSU)*, 17(4). <https://doi.org/10.32345/2664-4738.4.2021.18>
3. Юр'єв С. Д. Алгоритм відбору пацієнтів з алергічним ринітом і сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу для проведення алерген-імунотерапії / С. Д. Юр'єв, А. І. Курченко, Г. В. Федорук // Імунологія та алергологія: наука і практика. - 2019. - № 1. - С. 46-53. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_1\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_1_7).
4. Юр'єв, С. Д., Курченко А, І. (2022). Особливості імунної відповіді у пацієнтів з цілорічним алергічним ринітом та сенсibiliзацією до кліщів домашнього пилу. doi: 10.31655/2307-3373-2022-1-2-35-42
5. Зубченко С.О., Гайдучок І.Г., Юр'єв С.Д., Чопяк В.В. (2022) Оцінка клінічної ефективності алергенімунотерапії у пацієнтів з алергічними хворобами. *Імунологія та алергологія: Наука і практика*. 3-4'2020 doi:10.37321/immunology.2020.3-4-08
6. Rodinkova VV, Yuriev SD, Kryvopustova MV, Mokin VB, Kryzhanovskiy YM and Kurchenko AI (2022) Molecular Profile Sensitization to House Dust Mites as an Important Aspect for Predicting the Efficiency of Allergen Immunotherapy. *Front. Immunol.* 13:848616. doi: 10.3389/fimmu.2022.848616

7. Yuriev S, Rodinkova V, Mokin V, Varchuk I, Sharikadze O, Marushko Y, Halushko B, Kurchenko A. Molecular sensitization pattern to house dust mites is formed from the first years of life and includes group 1, 2, Der p 23, Der p 5, Der p 7 and Der p 21 allergens. *Clin Mol Allergy*. 2023 Feb 3;21(1):1. doi: 10.1186/s12948-022-00182-z. PMID: 36737770; PMCID: PMC9898923.
8. Okhotnikova ON, Sharikadze OV, Yuriev SD (2018) Primary Prevention of Allergic Diseases: Dreams or Reality? *J Tradit Med Clin Natur* 7: 260. DOI: 10.4172/2573-4555.1000260.
9. Marushko YuV, Halushko BL, Yuriev CD, Hyshchak TV. (2022). Sensitization profile to house dust mite allergens in children with allergies in Ukraine. *Modern Pediatrics. Ukraine*. 6(126): 30-36. doi 10.15574/SP.2022.126.30. Article received: Jul 12, 2022. Accepted for publication: Oct 20, 2022.
10. Зубченко С., Чоп'як В., Колінковський О., Юр'єв С., Шарикадзе О. Порівняльний аналіз альтернативних методів діагностики профілю сенсibiliзації пацієнтів західного регіону України. *Імунологія та алергологія: наука і практика*. - 2019. - № 3. - С. 45-59. - Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita\\_2019\\_3\\_7](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ita_2019_3_7).



**Відомості про апробацію результатів дисертації**

**Основні положення дисертації доповідались автором на наукових форумах та публікувались в друкованих матеріалах конгресів:**

1. Yuriev, S., et al. "DIAGNOSTIC FEATURES OF HOUSE DUST MITE SENSITIZATION." ANNALS OF ALLERGY ASTHMA & IMMUNOLOGY. Vol. 125. No. 5. STE 800, 230 PARK AVE, NEW YORK, NY 10169 USA: ELSEVIER SCIENCE INC, 2020. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.anai.2020.08.081>
2. Yuriev S. et al. IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH IGE DEPENDENT AND IGE INDEPENDENT DUST MITE ALLERGIC RHINITIS //Annals of Allergy, Asthma & Immunology. – 2022. – Т. 129. – №. 5. – С. S73. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2022.08.712>
3. Yuriev, S. D. "Prevalence of sensitization to house dust mite allergens in adults." ALLERGY. Vol. 76. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY, 2021.
4. Виступ на Конгресі Європейської академії алергії та клінічної імунології (EAACI Congress) (Мадрид-Краків, 10-12 червня 2021 р.)
5. Виступ на Конгресі Європейської академії алергії та клінічної імунології (EAACI Congress) (Прага, 1-3 липня 2022 р.)
6. Виступ на Конгресі Європейської академії алергії та клінічної імунології (EAACI Congress) (Гамбург, 9-11 липня 2023 р.)

На електронний документ накладено: 1 (Один) підписи чи печатки:  
На момент друку копії, підписи чи печатки перевірено:  
Програмний комплекс: eSign v. 2.3.0;  
Засіб кваліфікованого електронного підпису чи печатки: ІТ Користувач ЦСК-1Експертний  
висновок: №05/02/02-1424 від 05.04.2016;  
Цілісність даних: не порушена;

Підпис № 1 (реквізити підписувача та дані сертифіката) Підписувач: ІОР'ЄВ  
СЕРГІЙ ДМИТРОВИЧ 2595713657;  
Належність до Юридичної особи: ФІЗИЧНА ОСОБА; Код юридичної  
особи в ЄДР: 2595713657;  
Серійний номер кваліфікованого сертифіката: 5E984D526F82F38F0400000014CA31012ED99604; Видавник  
кваліфікованого сертифіката: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК";  
Тип носія особистого ключа: Незахищений; Тип підпису:  
Удосконалений;  
Сертифікат: Кваліфікований;  
Час та дата підпису: 20:29 23.11.2023;  
Чинний на момент підпису. Підтверджено позначкою часу для підпису від АЦСК (кваліфікованого надавача  
електронних довірчих послуг)

