

# IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS AND FEATURES OF THE NASAL MICROBIOTA IN PATIENTS WITH ASPIRIN BRONCHIAL ASTHMA

Lazareva A.M.<sup>1</sup>, Lapteva L.V.<sup>2</sup>, Kolenchukova O.A.<sup>3</sup>, Smirnova S.V.<sup>4</sup>  
(Russian Federation) Email: Lazareva516@scientifictext.ru

<sup>1</sup>Lazareva Anna Mikhailovna - Junior Researcher;

<sup>2</sup>Lapteva Lyudmila Vladimirovna - Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Allergist-Immunologist, Leading Scientific Research;

<sup>3</sup>Kolenchukova Oksana Alexandrovna – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Leading Researcher;

<sup>4</sup>Smirnova Svetlana Vitalievna - Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the scientific direction,

RESEARCH INSTITUTE OF MEDICAL PROBLEMS OF THE NORTH -  
SEPARATE DIVISION

FEDERAL RESEARCH CENTER "KRASNOYARSK SCIENTIFIC CENTER OF  
THE SIBERIAN BRANCH OF THE RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES»,  
KRASNOYARSK

**Abstract:** *the immunological characteristics and composition of the microbiota of the nasal mucosa in aspirin bronchial asthma (AsBA) were studied. The study involved patients with AsBA (n=37) and a control group consisting of virtually healthy blood donors and nasal discharge (n=219) aged 18 to 64 years. It was revealed that AsBA is characterized by a high content of CD3 + lymphocytes due to the high content of cytotoxic cells against the background of a decrease in NK-lymphocytes, low level of B-lymphocytes and as a result-low synthesis of immunoglobulins IgG4 and secretory IgA in the nasal discharge. The microbial composition is characterized by an increase in the total number of microbial flora relative to control by increasing the content of Staphylococcus and Streptococcus.*

**Keywords:** *aspirin bronchial asthma, immune status, cytokines.*

## ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ОСОБЕННОСТИ НАЗАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С АСПИРИНОВОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Лазарева А.М.<sup>1</sup>, Лаптева Л.В.<sup>2</sup>, Коленчукова О.А.<sup>3</sup>, Смирнова С.В.<sup>4</sup>  
(Russian Federation)

<sup>1</sup>Лазарева Анна Михайловна – младший научный сотрудник;

<sup>2</sup>Лаптева Людмила Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент, врач аллерголог-иммунолог, ведущий научный сотрудник;

<sup>3</sup>Коленчукова Оксана Александровна – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник;

<sup>4</sup>Смирнова Светлана Витальевна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель научного направления,

Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера – обособленное подразделение

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр  
Сибирского отделения Российской академии наук»,  
г. Красноярск

**Аннотация:** изучены иммунологические характеристики и состав микробиоты слизистой оболочки носа при аспириновой бронхиальной астме (АсБА). В исследовании приняли участие больные АсБА (n=37) и группа контроля, состоящая из практически здоровых доноров крови и назального отделяемого (n=219) в возрасте от 18 до 64 лет. Выявлено, что для АсБА характерно высокое содержание CD3<sup>+</sup> лимфоцитов за счет высокого содержания цитотоксических клеток на фоне снижения NK-лимфоцитов, низкий уровень В-лимфоцитов и как следствие – низкий синтез иммуноглобулинов IgG4 и секреторного IgA в назальном отделяемом. Микробный состав характеризуется повышением общего количества микробной флоры относительно контроля за счет повышения содержания *Staphylococcus* и *Streptococcus*.

**Ключевые слова:** аспириновая бронхиальная астма, иммунный статус, цитокины.

УДК 612.017.1: 616.2

Бронхиальная астма – хроническое воспалительное заболевание дыхательных путей, в котором принимают участие многие клетки и клеточные элементы. Хроническое воспаление обуславливает развитие бронхиальной гиперреактивности, которая приводит к повторяющимся эпизодам свистящих хрипов, одышки, чувства заложенности в груди и кашля, в особенности по ночам или ранним утром. Приступы одышки связаны с распространенной обструкцией дыхательных путей, которая часто бывает обратимой спонтанно или под влиянием лечения [1,6].

Следует отметить, что диагноз БА в первую очередь устанавливается на фоне клинической картины. Важной особенностью является отсутствие стандартизированных характеристик симптомов или лабораторных или

инструментальных исследований, которые помогли бы с точностью установить диагноз бронхиальной астмы. В связи с этим невозможно разработать рекомендации по диагностике БА, основанные на доказательной базе [2,4,5].

Особым патогенетическим вариантом бронхиальной астмы является аспириновая астма. Этот вид бронхоспазма не связан с атопическими механизмами. Существует теория повышенного выброса в кровотоки лейкотриенов (являющихся мощными бронхоконстрикторами) при приеме аспирина или ненаркотических анальгетиков. Помимо отсутствия атопии в своем патогенезе, аспириновая астма отличается трудно контролируемым течением заболевания, высокими дозами кортикостероидов и инвалидизацией пациентов [3,10]. Ввиду отсутствия единой теории патогенеза развития данной патологии интересным является изучение состава микробиоты слизистой носа как пускового фактора воспалительного процесса в дыхательных путях.

**Цель исследования:** изучить характеристики иммунного статуса, содержания цитокинов и микробиоты слизистой оболочки носа при аспириновой астме.

#### **Материалы и методы.**

В исследовании приняли участие пациенты с диагнозом аспириновой астмы (АсБА), n=32) в возрасте от 22 до 58 лет. Группу контроля составляли практически здоровые доноры крови ГБУЗ «Красноярского краевого центра крови №1» (n=219), сопоставимые по полу и возрасту. Диагностика АсБА проводил аллерголог-иммунолог. У всех пациентов исключены атопические механизмы патогенеза БА. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к CD3+, CD3+CD8+, CD3+CD4+, CD4+CD8+, CD16/56, CD3+CD16/56, CD19+. Определение концентрации IgA, IgM и IgG, IgE, sIgA, цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , и IFN- $\gamma$ , пг/мл) в сыворотке крови и назальном секрете определяли иммуноферментным методом.

Изучение состава микробиоты во время обострения заболевания проводили посредством посева отделяемого со слизистой оболочки носа на питательные дифференциально-диагностические среды (кровяной агар, желточно-солевой агар, Эндо, энтерококк-агар). Смывы со слизистой носа забирали с помощью стерильных тумферов с коммерческой транспортной средой Эймса. Посев проводили методом секторов. Инкубировали в термостате при температуре 37<sup>0</sup> С в течении 24 часов. Подсчет микроорганизмов проводили по расчетной таблице.

У каждого пациента взято письменное информированное согласие, протокол обследования больных и здоровых людей (контрольная группа) соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике НИИ МПС.

Обработка полученных результатов выполнена с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Выборка описана с подсчетом медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C25 и C75). Нормальность распределения проверялась методом Колмагорова-Смирнова. Достоверность различий независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез равен 0,05.

### Результаты

При АсБА по сравнению с контрольной группой установлено повышение общего количества лейкоцитов и абсолютного содержания CD3<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>- и снижение процентного и абсолютного количества CD16<sup>+</sup>- и CD19<sup>+</sup>-лимфоцитов. Снижены концентрации иммуноглобулинов IgG4 и секреторного IgA (Табл.1,2).

Таблица 1. Показатели клеточного звена иммунитета при АсБА, Me (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>)

Показатели	Здоровые, n=209	АсБА, n=37
	1	2
Лейкоциты (10 <sup>9</sup> /л)	5,25 (4-6,25)	6,55 (5,50-8,05) p <sub>1</sub> =0,007
Лимфоциты (%)	40,0 (35,0-47,0)	28,0 (24,5-40,5) p <sub>1</sub> <0,001
CD3 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	69,0 (64,0-76,1)	69,5 (65,0-78,0) P <sub>1</sub> =0,006
CD4 <sup>+</sup> (%)	42,4 (35,7-47,3)	43,0 (32,0-48,0) p <sub>2</sub> =0,03
CD4 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,80 (0,64-1,19)	0,84 (0,55-1,27)

CD8 <sup>+</sup> (%)	26,0 (22,4-30,7)	29,5 (25,0-35,0) p <sub>1</sub> =0,02
CD16 <sup>+</sup> (%)	15,5 (11,0-20,0)	13,0 (11,0-16,0) P <sub>1</sub> =0,04
CD16 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,31 (0,19-0,45)	0,21 (0,16-0,34) p <sub>1</sub> =0,05

Примечание. Статистически достоверные различия: p<sub>1</sub>-с группой контроля

*Таблица 2. Показатели гуморального звена иммунитета при АсБА, Ме (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>)*

Показатели	Здоровые, n=209	АсБА, n=37
	1	2
CD19 <sup>+</sup> (%)	14,0 (10,8-18,5)	12,0 (9,0-16,0) P <sub>1</sub> =0,004
CD19 <sup>+</sup> (10 <sup>9</sup> /л)	0,30 (0,19-0,43)	0,23 (0,20-0,26)
IgA(г/л)	1,65 (0,78-3,07)	2,00 (1,50-2,20)
IgM(г/л)	1,37 (0,44-3,34)	1,20 (1,00-1,40)
IgG(г/л)	12,79 (5,21-20,80)	9,90 (8,10-11,99)
sIgA МЕ/мл (назальные смывы)	20,00 (10,00-47,00)	0,10 (0,10-0,10) p <sub>1</sub> <0,001

Примечание. Статистически достоверные различия: p<sub>1</sub>-с группой контроля

В группе АсБА по сравнению с контролем установлено увеличение концентрации IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ и TNF-α в назальном секрете и сыворотке крови и снижение IL-6 в сыворотке крови (Табл.3,4,).

*Таблица 3. Показатели концентрации цитокинов в сыворотке крови при АсБА , Ме (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>)*

Показатели (пг/мл)	Здоровые, n=209	АсБА, n=37
	1	2
IL-2	1,45 (0,10-4,05)	7,25 (6,33-15,22) $p_1 < 0,001$
IL-4	4,80 (1,70-8,50)	7,60 (6,30-13,07) $p_1 < 0,001$
IL-6	1,30 (0,10-2,10)	6,60 (0,10-21,05) $p_1 < 0,001$
IL-10	3,50 (0,80-5,40)	9,05 (5,25-13,90) $p_1 = 0,002$
IFN- $\gamma$	0,10 (0,10-0,10)	29,10 (18,40-209,60) $p_1 < 0,001$
TNF- $\alpha$	7,25 (0,90-27,70)	17,80 (0,10-27,80)

Примечание. Статистически достоверные различия:  $p_1$ -с группой контроля

Таблица 4. Показатели концентрации цитокинов в назальных смывах при АсБА, Ме (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>)

Показатели (пг/мл)	Здоровые, n=209	АсБА, n=37
	1	2
IL-2	0,10 (0,10-0,10)	8,10 (7,80-8,80) $p_1 < 0,001$
IL-4	2,00 (0,10-8,00)	4,50 (0,55-17,00)
IL-6	0,10 (0,10-3,50)	3,00 (0,10-10,00)
IL-10	0,10 (0,10-0,20)	8,80 (1,15-11,60)
IFN- $\gamma$	0,10 (0,10-0,10)	30,20 (0,10-31,00) $p_1 = 0,006$

Примечание. Статистически достоверные различия:  $p_1$ -с группой контроля

При исследовании микробного пейзажа выявлено повышение общего количества микроорганизмов, а также бактерий рода *Staphylococcus* и *Streptococcus* относительно группы контроля (Табл. 5).

Таблица 5. Состав микрофлоры слизистой оболочки носа при АсБА, Ме (C<sub>25</sub>-C<sub>75</sub>)

Показатели (КОЕ/мл)	Здоровые, n=209	АсБА, n=37
	1	2
<i>Staphylococcus spp.</i>	10000 (1000-10110)	1000000 (500000-50000000) $P_1 < 0,001$
<i>Streptococcus spp.</i>	1000 (550-1000)	500000 (50000-50000000) $P_1 < 0,001$
<i>Enterococcus spp.</i>	0(0-0)	100 (1000-1000)
<i>Enterobacteriaceae spp.</i>	1000 (100-10000)	10000 (1000-500000)
Общее количество	15780 (1000-20800)	2104000 (1011000-00000000) $P_1 < 0,001$

Примечание. Статистически достоверные различия:  $P_1$ -с группой контроля

### Обсуждение результатов исследования

Таким образом, при аспириновой астме происходит повышение уровня Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>) за счет высокого содержания цитотоксических клеток на фоне снижения NK-лимфоцитов. При этом, наблюдается низкий уровень В-лимфоцитов и как следствие – низкий синтез иммуноглобулинов IgG4 и секреторного IgA в назальном отделяемом. Секреторный иммуноглобулин можно расценивать как первую линию защиты от инфекционных факторов окружающей среды [9].

Исследование концентраций различных цитокинов показало разносторонние изменения в содержании противо- и провоспалительных цитокинов. Так, повышены концентрации провоспалительных (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), противовоспалительных (IL-4) и снижение концентрации провоспалительных (IL-6) цитокинов при астматической триаде. За активацию В-лимфоцитов

отвечают IL-2, IL-6 и IL-4, а IL-10 и IFN $\gamma$  напротив, угнетают гуморальный ответ [7,8,10].

Высокое содержание микрофлоры слизистой оболочки носа, свыше 10<sup>4</sup> КОЕ/мл, принято считать патологическим и требующим лечения. Установленный дисбактериоз можно рассматривать как одну из причин воспаления, так и следствие нарушений в работе иммунитета. В развитии воспалительного процесса на слизистой оболочке носа при АсБА принимают участие грамположительные кокки рода *Staphylococcus* и *Streptococcus* [2,4]. Повышение численности микрофлоры, относящейся к стрептококкам и стафилококкам сигнализирует о снижении гуморального и клеточного иммунитета и возникновении воспалительной реакции на слизистой носа. [11,12].

#### **Выводы:**

1. Иммуноный статус при аспириновой бронхиальной астме характеризуется активацией Т-лимфоцитов и снижением активности гуморального звена иммунитета.
2. При аспириновой бронхиальной астме в сыворотке крови и назальном отделяемом характерен дисбаланс концентрации противовоспалительных и провоспалительных цитокинов.
3. При аспириновой бронхиальной астме на слизистой оболочке носа обнаружен выраженный дисбиоз.

#### ***Список литературы / References***

1. Битеева Д.В. Аспириновая бронхиальная астма в практике врача-аллерголога. / Д.В. Битеева // Вестник семейной медицины, 2012. № 1. С. 24-29.
2. Бондарева Г.П. Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой / Г.П. Бондарева, А.О. Терехова // Вестник оториноларингологии, 2010. № 3. С. 9-10.
3. Игнатова И.А. Дифференциальная диагностика и иммунологические показатели у больных истинной аллергической и псевдоаллергической риносинусопатией / И.А. Игнатова, С.В. Смирнова, С.В. Кадричева // Российская ринология, 2009. Т. 17. № 2. С. 74.
4. Коленчукова О.А. Особенности иммунитета у больных аллергическим риносинуситом в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции / О.А. Коленчукова, С.В. Смирнова, А.А. Савченко // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2012. № 3. С. 83-87.

5. *Смирнова С.В.* Патогенез истинной аллергии и псевдоаллергии: учебно-методическое пособие / С.В. Смирнова, В.И. Пыцкий. Красноярск, 2002. 21 с.
6. *Смирнова С.В.* Клинико-патогенетические варианты аллергической риносинусопатии / С.В. Смирнова // Пульмонология? 2001. № 5. С. 223.
7. *Смирнова С.В.* Концентрация IL-2, IL-4, IL-6 и IFN $\gamma$  в сыворотке периферической крови и назальных смывах при респираторной атопии и псевдоатопии / С.В. Смирнова, Л.В. Зенкина, И.А. Игнатова и др. // Российский аллергологический журнал, 2005. № 1. С. 30-33.
8. *Шагарова С.Г.* Содержание некоторых цитокинов в сыворотке крови и назальных смывах у больных бронхиальной астмой / С.Г. Шагарова, С.В. Смирнова // Цитокины и воспаление, 2010. Т. 9. № 4. С. 137-138.
9. *Bondareva G.* Polypous rhinosinusitis and bronchial asthma: clinical and immunological aspects / G. Bondareva, T. Poljakova, O. Romanova // Российская ринология, 2006. № 3. С. 47-49.
10. *Forster U.* Eicosanoid imbalance correlates in vitro with the pattern of clinical symptoms of Samter's triad. / U. Forster, S. Strathmann, D. Schafer et al. // Rhinology, 2013. Vol. 51 (1). P 6-9.
11. *Hutcheson P.S.* Distinctions between allergic fungal rhinosinusitis and chronic rhinosinusitis / P.S. Hutcheson, M.S. Schubert, R.G. Slavin // Am. J. Rhinol. Allergy. 2010. Vol. 24 (6). P. 405–408.
12. *Smirnova S.V.* Concentration of IL-2, IL-4, IL-8 and TNF $\alpha$  in blood serum in bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease / S.V. Smirnova, S.G. Kadricheva, L.V. Zenkina // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2009. Т. 179. № 8. A 1314-A1314.
13. *Dobretsov K.* The theory of a "staphylococcus superantigen" in chronic rhinosinusitis with nasal polyps: myth or reality? / K. Dobretsov, H. Negm, M. Ralli, D. Passali // European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2019. Т. 23. № 1. С. 48-54.
- 14.