

# Патогенетическое значение сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток у детей с атопической бронхиальной астмой

В. А. Булгакова

ГУ Научный центр здоровья детей РАМН, г. Москва

## Резюме

*Статья посвящена исследованию сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток при атопической бронхиальной астме. Изучено содержание растворимых мембранных рецепторов активации, также модулирующих процессы апоптоза — sCD<sub>30</sub>, sCD<sub>40</sub>, sCD<sub>95</sub> (sAPO-1/FAS), растворимого лиганда FAS (sFASL), лиганда TRAIL (Apo-2L), ранних свидетелей эффекторной стадии апоптоза фермента Caspase-1/ICE и белка Annexin V. Установлены достоверные отличия концентрации указанных показателей от их референтных уровней, наиболее выраженные при тяжелом течении болезни, а также при наличии сопутствующей вирусной и бактериальной инфекции, свидетельствующие об изменении процесса как FAS-, так и TRAIL-индуцированного апоптоза провоспалительных и иммунокомпетентных клеток при атопической бронхиальной астме.*

Несмотря на широкомасштабные усилия мирового медицинского сообщества по профилактике и улучшению контроля течения бронхиальной астмы продолжает оставаться одной из наиболее распространенных болезней детского возраста во многих странах [4]. В основе патогенеза бронхиальной астмы у детей лежат иммунные механизмы, среди которых доминирует немедленный (атопический) тип аллергических реакций [1, 2]. Атопическая форма бронхиальной астмы выявляется практически у 90% детей с этой патологией. Атопическая бронхиальная астма рассматривается как хроническое аллергическое воспаление бронхов, обусловленное стимуляцией различными аллергенами антигенпрезентирующих и иммунокомпетентных клеток, активацией клона Т-лимфоцитов-хелперов 2-го типа (Th<sub>2</sub>), с последующей активацией цитокинов и продукцией плазматическими клетками специфических антител класса IgE [1, 4]. В развитии аллергического воспаления в слизистой бронхов при бронхиальной астме и последующее ее персистирование, характеризующее тяжесть течения астмы, определяющую роль играет не только функциональная активность, но и нарушение элиминации клеток, участвующих в воспалении [3]. В патогенезе аллергических болезней, в том числе атопической бронхиальной астмы, важное место занимает вторичная иммуносупрессия, в развитии которой предполагается нарушение апоптотических процессов [2, 8].

В литературе представлены в основном результаты исследования при аллергической патологии цитокинового статуса, а также экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов, в том числе маркера активации и апоптоза клеточного рецептора CD<sub>95</sub>, по которому судят об активации клеток и их готовности к FAS-индуцированному апоптозу. Однако в процессе апоптоза решающая роль принадлежит также системе лигандов, основных индукторов сигнала к запуску апоптоза, а также системе каспаз, отвечающих за эффекторное звено апоптоза. Кроме того, помимо FAS-опосредованного апоптоза существуют другие пути передачи сигнала клетке через систему рецептор-лиганд. Наряду с мембранными антигенами иммунокомпетентных клеток важную роль в реализации иммунного ответа играют образующиеся за счет протеолитического слущивания (расщепления) их внеклеточной части с поверхности клетки или альтернативного сплайсинга матричной РНК, приводящего к образованию укороченного транскрипта, альтернативного сплайсинга матричной РНК их растворимые формы, характерные для всех этапов гемопоэза: активации, дифференцировки, пролиферации, апоптоза [7].

Расширение представления о роли различных звеньев иммуорегуляции при бронхиальной астме имеет патогенетическое значение и способствует совершенствованию методов иммунологического мониторинга болезни, что в свою очередь позволит точнее прогнозировать

В. А. Булгакова — к. м. н., докторант Научного центра здоровья детей РАМН.

тяжесть течения астмы и сможет помочь своевременному и адекватному выбору тактики терапии с целью достижения и поддержания контроля над клиническими проявлениями астмы у детей.

Целью настоящей работы явилось исследование сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток у детей с atopической бронхиальной астмой.

### Материалы и методы

Проведено обследование 88 детей в возрасте от 5 до 16 лет: 73 человека с подтвержденным диагнозом atopической бронхиальной астмы, госпитализированные в аллергологическое отделение НЦЗД РАМН, и 15 практически здоровых детей (без признаков аллергических, аутоиммунных, инфекционных и паразитарных заболеваний), проходивших диспансеризацию. У 23 пациента с бронхиальной астмой отмечалось легкое (контролируемое), у 35 среднетяжелое (частично контролируемое) и у 15 тяжелое (неконтролируемое) течение болезни. Исследование содержания в крови растворимых мембранных рецепторов активации, также модулирующих процессы апоптоза — sCD<sub>30</sub>, sCD<sub>40</sub>, sCD<sub>95</sub> (sAPO-1/FAS), растворимого FAS лиганда (sFASL), индуцирующего апоптоз TNF-зависимого лиганда для рецепторов DR<sub>4</sub> и DR<sub>5</sub> TRAIL, свидетелей ранней стадии эффекторного этапа апоптоза — фермента, преобразующего IL-1 $\beta$ , Caspase-1/ICE (ICE — IL-1 $\beta$  Converting Enzyme) и последующей его стадии белка Annexin V осуществлялось следующим образом. Для исследования использовалась венозная кровь, взятая из локтевой вены обследуемого утром, натощак, во время проведения планового лабораторного обследования, в стерильную полипропиленовую пробирку. Кровь центрифугировалась при 2000 об/мин в течение 15 минут, отбиралась сыворотка и проводилось количественное определение концентраций указанных маркеров посредством иммуноферментного энзим-связанного иммуносорбентного анализа (enzym-linked immunosorbent assay — ELISA) с помощью коммерческих наборов (или сыворотка хранилась при температуре минус 40° до проведения процедуры анализа). Принцип твердофазного энзим-связанного иммуносорбентного анализа заключается в том, что моноклональные антитела, специфичные к исследуемому антигену фиксированы на поверхности лунок 96-луночной планшеты. При добавлении к ним проб сыворотки крови или стандартов, исследуемый антиген, связывается иммобилизованными антителами. После удаления отмыванием не связанных протеев в лунки добавляются поликлональные антитела, связанные с энзимом, которые наслаиваются на иммобилизованный в

ходе первой инкубации антиген по принципу «сэндвича». После этого их излишек отмывается и в лунки добавляется раствор хромогенного субстрата, который, прореагировав с энзимом, дает характерное окрашивание. По интенсивности последнего оценивается содержание в пробе исследуемого антигена: результаты учитываются путем измерения оптической плотности раствора в лунках с помощью абсорбционного спектрофотометра (иммуноферментного анализатора) при длине волны 405 нм и применения калибровочной кривой, получаемой при проведении реакции со стандартными растворами. Концентрация исследуемых показателей изучалась с использованием коммерческих наборов «Human sCD30 ELISA», «Human sCD40 ELISA», «Human sAPO-1/FAS ELISA», «Human sFAS Ligand ELISA», «Human TRAIL ELISA», «Human Caspase-1/ICE ELISA», «Human Annexin V ELISA» (Bender MedSystems GmbH, Austria) согласно рекомендациям производителя на автоматическом иммуноферментном анализаторе «Coda» (Bio-Rad Laboratories, USA).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием критерия Стьюдента с помощью компьютерной программы Statistica (StatSoft, версия 6,0) с расчетом средней арифметической величины  $M$  и ошибки репрезентативности средней величины  $m$  ( $M \pm m$ ), для выяснения статистической зависимости между изучаемыми параметрами использовался коэффициент корреляции  $r$ , различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Сравнение усредненных уровней концентрации сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток крови детей с atopической астмой выявило статистически достоверные отличия их содержания от референтных уровней (таблица).

Представление CD<sub>30</sub> связано с дифференцировочным и активационным этапом Т-клеток человека, продуцирующих цитокины, характерные для Th<sub>2</sub>-клеток [6, 9]. Взаимодействия цитокинового рецептора CD<sub>30</sub> со своим лигандом имеет плейотропные биологические эффекты, такие как дифференцировка, активация, пролиферация и клеточная гибель. В CD<sub>30</sub><sup>+</sup> клеточных линиях связывание лиганда CD<sub>30</sub> (CD<sub>30L</sub>) индуцирует гибель клеток в процессе апоптоза. Более того, CD<sub>30</sub> вполне может быть вовлечен в контроль сигнала CD<sub>40</sub>/CD<sub>40L</sub>, пролиферацию Т-клеток и созревание В-клеток, индуцированное Т-клеточными цитокинами. Таким образом, CD<sub>30</sub> передает информацию, необходимую для иммунного ответа. Экспрессия CD<sub>30</sub> строго зависит от активации и пролиферации Т- и В-клеток. Сывороточное содержание s-формы CD<sub>30</sub>

(sCD<sub>30</sub>), образующейся за счет протеолитического расщепления своей мембранной предшественницы, служит маркером присутствия CD<sub>30</sub><sup>+</sup> клеток. Средний уровень растворимой молекулы sCD<sub>30</sub> у детей с бронхиальной астмой был достоверно выше референтного уровня (61,0±5,3±5,02 и 34,4±0,3 U/ml), также наблюдалась сопряженность уровня исследуемого показателя с тяжестью течения и рецидивом болезни.

CD<sub>40</sub> играет важную роль в выживаемости, росте и дифференцировке В-клеток. Передача сигнала через CD<sub>40</sub> обуславливает основные события Т-В взаимодействия: переключение классов иммуноглобулинов, индукцию пролиферации и дифференцировки при гуморальном иммунном ответе. Отдельные виды анти-CD<sub>40</sub> моноклональных антител запускают выраженную пролиферацию высокоочищенных покоящихся В-клеток в отсутствие других костимулов *in vitro*, и возможно в естественных условиях соответствующие антитела (например, аутоантитела) или иные лиганды в растворимой форме, например sCD<sub>40L</sub> (sCD<sub>154</sub>), могут облегчать запуск синтеза IgE, если присутствует IL-4- (или IL-13) опосредованный стимул [6]. Высвобождение В-лимфоцитами растворимой CD<sub>40</sub> предполагает ингибицию синтеза матричной РНК лиганда — CD<sub>154</sub>. Показано, что процесс апоптоза вовлечен в элиминирование клонов аутореактивных лимфоцитов при нормальном функционировании иммунной системы. Опосредованный В-клеточный апоптоз блокируется при передаче сигнала через молекулу CD<sub>40</sub> на поверхности В-клетки. Так как

CD<sub>40L</sub> экспрессируется активированными Т-хелперными клетками, В-клетки могут удаляться путем апоптоза и активироваться при взаимодействии иммунной системы с внешним антигеном. Таким образом, взаимодействие CD<sub>40</sub>-CD<sub>40L</sub> играет центральную роль в различных фазах В-клеточного ответа на Т-зависимые антигены. Роль растворимой молекулы CD<sub>40</sub> пока не совсем ясна. Возможно, она блокирует действие CD<sub>40L</sub> и ингибирует активацию В-лимфоцитов. Средняя концентрация sCD<sub>40</sub> у детей с бронхиальной астмой была ниже, чем в группе сравнения (24,54±3,41 и 35,3±0,4 pg/ml), значительно отличаясь при тяжелом течении астмы.

Ключевыми молекулами апоптоза являются рецепторы смерти, которые передают внутрь клетки сигналы, поступающие в виде лигандов смерти. Рецепторы смерти принадлежат суперсемейству рецептора фактора некроза опухолей (TNFR)/рецептора фактора роста нервов (NGFR). Отличительной чертой членов этого суперсемейства является наличие экстраклеточного домена, содержащего повторы, богатые цистеином, формирующим поверхность, ответственную за взаимодействие с лигандом. Наиболее изученными рецепторами смерти являются CD<sub>95</sub> (он же Apo-1 и Fas) и рецептор фактора некроза опухолей — 1 (TNFR1, он же p55). К рецепторам смерти относятся также рецептор смерти — 3 (DR<sub>3</sub>, он же Apo-3), рецептор смерти — 5 (DR<sub>5</sub>, он же Apo-2), рецепторы смерти 4 и 6 (DR<sub>4</sub> и 6). За исключением фактора роста нервов, лиганды рецепторов смерти сходны между собой по структуре и принадлежат суперсемейству фак-

Таблица Содержание сывороточных маркеров активации и апоптоза у обследованных детей (M±m)

Параметры	sCD <sub>95</sub>	sFASL	TRAIL	sCD <sub>30</sub>	sCD <sub>40</sub>	Caspase-1/ICE	Annexin V
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	U/ml	pg/ml	pg/ml	ng/ml
Средняя величина при бронхиальной астме (БА), n=73	579,79± 25,17*	0,15± 0,03	441,82± 29,23*	61,0± 5,3*	24,54± 3,41*	44,19± 5,3	4,1± 0,93*
Легкое течение БА, n=23	490,49± 32,87*	0,18± 0,05	498,92± 31,35*	45,7± 4,6*	28,76± 3,14	47,01± 5,52	5,15± 0,99*
Среднетяжелое течение БА, период ремиссии, n=35	593,7± 31,2*#	0,15± 0,01*#	484,62± 22,61*	56,2± 6,1*#	24,94± 3,24*	45,5± 5,11*	4,0± 0,89*
Среднетяжелое течение БА, период обострения, n=35	637,64± 38,4*#	0,13± 0,01*#	434,78± 27,43*	60,1± 6,3*#	25,54± 3,52*	41,99± 5,38*	3,05± 0,73*
Тяжелое течение БА, n=15	598,99± 34,32*#	0,14± 0,09*#	401,81± 28,2#	76,2± 5,1*#	19,35± 2,96*#	42,17± 5,33*#	4,11± 0,86*
БА с рецидивирующей респираторной инфекцией, n=49	592,86± 42,31*	0,16± 0,01	451,62± 29,93*	62,9± 5,1*	30,02± 4,32	41,12± 4,93*	4,9± 0,97*
Здоровые дети, n=30	400,5± 4,9	0,21± 0,01	706,4± 7,4	34,4± 0,3	35,3± 0,4	53,7± 0,5	21,3± 0,2

Примечание. \* —  $p < 0,05$  — в сравнении со здоровыми детьми; # —  $p < 0,05$  — в сравнении с легким течением астмы.

тора некроза опухолей. Лигандом для Fas является FasL (Apo-1L), лигандами для TNFR1 — фактор некроза опухолей и лимфотоксин  $\alpha$ , для рецепторов смерти 4 и 5 — TRAIL (Apo-2L), для рецептора смерти 3 — TWEAK (Apo-3L). Известно, что рецептор CD95, выступающий как поздний активационный маркер, представлен преимущественно на Т-лимфоцитах-хелперах, тогда как CD178 — на Т-клетках-киллерах [9]. Взаимодействие рецептора FASL (или CD178) с FAS-рецептором (CD95) является важнейшим механизмом активационной элиминации лимфоцитов, выполнивших свою функцию. Предполагается, что растворимый sCD95, продукт альтернативного сплайсинга матричной РНК, выступает в качестве ингибитора связывания FAS с FAS-лигандом и блокирует FAS-опосредованный апоптоз, взаимодействуя с FAS-лигандом на поверхности клетки. Растворимая форма FASL (или sCD178), циркулируя в крови, может провоцировать клетки, имеющие на своей поверхности FAS-рецепторы, к апоптозу. У обследованных пациентов среднее содержание sCD95 было выше, а sFASL несколько ниже, чем в группе сравнения (соответственно  $579,79 \pm 25,17$  и  $400,5 \pm 4,9$  pg/ml,  $0,15 \pm 0,03$  и  $0,21 \pm 0,01$  pg/ml), также наблюдалась сопряженность уровня sCD95 с периодом и тяжестью течения болезни.

В отличие от FasL, экспрессированного, главным образом, на активированных Т- и НК-клетках и клетках иммунопrivилегированных зон, индуцирующий апоптоз TNF-зависимый лиганд для рецепторов DR<sub>4</sub> и DR<sub>5</sub> TRAIL (Apo-2L) был обнаружен во многих тканях организма. Однако, как и в случае с FasL, экспрессия TRAIL повышается в Т-лимфоцитах в ответ на антигенную стимуляцию [10]. Зрелые Т-лимфоциты приобретают чувствительность к Apo-2L-индуцированному апоптозу после воздействия интерлейкина-2, что говорит о возможной роли Apo-2L в контроле иммунных реакций [11]. Кроме того, показано возрастание чувствительности клеток к Apo-2L у пациентов с ВИЧ-инфекцией, что предполагает роль TRAIL-опосредованного апоптоза в уничтожении инфицированных вирусом клеток [10]. Средняя концентрация TRAIL у детей с бронхиальной астмой была ниже, чем в группе сравнения ( $441,82 \pm 29,23$  и  $706,4 \pm 7,4$  pg/ml), отмечалась сопряженность его уровня с обострением и утяжелением астмы.

При апоптозе, в отличие от физиологического ответа клетки, действуют свои, характерные только для апоптоза, специализированные необратимые реакции протеолиза, катализируемые специфическими протеазами, относящихся к классу цистеиновых протеаз. Эта группа протеаз, названная каспазы (caspases),

существует обособленно и функционирует как медиатор сигнала смерти. Активация каспаз является эффекторным этапом апоптоза. Каспазы существуют как инертные проферменты, активизирующиеся самостоятельно. К настоящему времени в различных клетках млекопитающих обнаружено 10 каспаз, образующих ферментативный каскад, подобно ферментативному каскаду свертывающей системы крови или системы комплемента. Фермент, преобразующий интерлейкин-1 $\beta$  (Caspase-1/ICE) в его естественную форму интерлейкин-1 в моноците, стал первым членом семейства каспаз. Оказалось, что он отвечает за многие протеолитические процессы в ранней стадии эффекторного этапа апоптоза и при воспалении. Средняя концентрация Caspase-1/ICE у детей с бронхиальной астмой была ниже, чем в группе сравнения ( $44,19 \pm 5,3$  и  $53,7 \pm 0,5$  pg/ml), более выраженные изменения выявлялись при обострении астмы. Учитывая в целом неспецифическую регулируемую роль протеаз в поддержании физиологического равновесия, в том числе иммунного баланса, выявленный дефицит сывороточного уровня Caspase-1/ICE, участвующего в эффекторном этапе апоптоза, может свидетельствовать и о ферментной дисфункции у пациентов с atopической бронхиальной астмой, и о нарушениях элиминации отслуживших иммунных клеток, что в свою очередь способствует утяжелению и хронизации аллергического воспалительного процесса.

Свидетелем начальной эффекторной стадии апоптоза или маркером элиминации активированных клеток также может выступать Annexin V — представитель семейства кальций-зависимых фосфолипид-связывающих протеинов. Средняя концентрация Annexin V у детей с бронхиальной астмой была ниже, чем в группе сравнения ( $4,1 \pm 0,93$  и  $21,3 \pm 0,2$  ng/ml), значительное отличие отмечалось при обострении и тяжелом течении астмы.

Одной из причин отсутствия контроля над симптомами астмы является рецидивирующая инфекция. Ранее нами было показано воздействие вирусных и бактериальных инфекций на иммунологическую реактивность детей с аллергической патологией [5]. В данной работе были также выявлены стойкие изменения концентрации исследуемых показателей у детей с бронхиальной астмой и рецидивирующей респираторной инфекцией, наиболее выраженные отличия отмечены в содержании sCD<sub>30</sub>, sCD<sub>95</sub> (таблица). Предполагается, что повышенный уровень растворимого антигена sCD<sub>95</sub>, ингибирующего апоптоз, является одной из причин слабого иммунного ответа на вирусную инфекцию и как следствие ее длительной персистенции в организме [6]. Выявленный характер

изменений в содержании sCD<sub>30</sub> у обследованных детей может отражать стойкую активацию Th<sub>2</sub>-лимфоцитов, обуславливающую развитие атопии, что в свою очередь является предрасполагающим фактором, способствующим инфицированию.

Проведенный анализ корреляционных взаимоотношений между средним содержанием изученных показателей выявил прямую зависимость между уровнями sCD<sub>95</sub> и sCD<sub>30</sub> ( $r=0,34$ ,  $p<0,05$ ), sFAS и Caspase-1/ICE ( $r=0,28$ ,  $p<0,05$ ), sFAS и Annexin V ( $r=0,29$ ,  $p<0,05$ ), обратная корреляционная зависимость была выявлена между содержанием sCD<sub>95</sub> и sFASL ( $r=-0,31$ ,  $p<0,05$ ), sCD<sub>30</sub> и sCD<sub>40</sub> ( $r=-0,30$ ,  $p<0,05$ ), sCD<sub>95</sub> и Caspase-1/ICE ( $r=-0,34$ ,  $p<0,05$ ), sCD<sub>95</sub> и Annexin V ( $r=-0,36$ ,  $p<0,05$ ), что характеризует патогенетические взаимосвязи этих показателей в процессе развития аллергического воспаления и свидетельствует о нарушении соотношения между активацией и элиминацией иммунокомпетентных и провоспалительных клеток при atopической бронхиальной астме у детей.

Таким образом, результаты исследования выявили достоверные изменения содержания сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток у детей с atopической бронхиальной астмой. Установлены достоверные отличия концентрации указанных показателей от их референтных уровней, наиболее выраженные при тяжелом течении болезни, в стадии обострения, а также при наличии сопутствующей инфекции, свидетельствующие об изменениях процесса как FAS-, так и TRAIL-индуцированного апоптоза провоспалительных и иммунокомпетентных клеток при atopической бронхиальной астме. Между исследованны-

ми показателями установлены множественные корреляционные взаимосвязи, что указывает на взаимообусловленность процессов рецепции (активации) и элиминации (апоптоза) в патогенезе бронхиальной астмы у детей. Исследование показало, что оценка уровня сывороточных маркеров активации и апоптоза иммунных клеток может быть использована в качестве дополнительного диагностического и прогностического критерия тяжести и выраженности atopической бронхиальной астмы у детей.

## Литература

1. Балаболкин И. И. Бронхиальная астма у детей; М.: Медицина. 2003; 320 с.
2. Балаболкин И. И., Смирнов И. Е., Булгакова В. А. и др. Сов. концепция патогенеза бронх. астмы у детей; Иммунология, аллергология, инфектология. 1, 2006; 26-35.
3. Бойчук С. В., Муштафин И. Г., Фассахов Р. С. Изучение апоптоза при atopической бронхиальной астме; Матер. X Нац. Конгресса по болезням органов дыхания. Санкт-Петербург, 2000; 26.
4. Бронхиальная астма у детей: диагностика, лечение и профилактика. Научно-практ. программа. М., 2004; 46с.
5. Булгакова В. А. Влияние вирусных инфекций на развитие и течение atopических болезней у детей. Автореф. ... канд. мед. наук. М.: 2002; 26 с.
6. Гуцин И. С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. — М.: Фармус Принт. 1998; 322 с.
7. Новиков В. В., Барышников А. Ю., Караулов А. В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы; Иммунология. 2007; 4: 249-253.
8. Порядин Г. В. Иммунные механизмы аллергических реакций; В сб. «Аллергия и иммунопатология (иммунные механизмы формирования, принципы терапии)»; под ред. Порядина Г. В. М., ВУНМЦ МЗ РФ. 1999; 24-38.
9. Ярилин А. А. Основы иммунологии. М., Мед, 1999; 216с.
10. Jeramias L, Herr I., Boehler T., Debatin K.M. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells; Eur. J. Immunol. 1998; 28: 1: 143-152.
11. Martinez-Lorenzo M.J., Alava M.A., Gamen S. et al. Involvement of APO-2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells; Eur. J. Immunol. 1998; 8: 9: 2714-2725.

## Сравнительная характеристика иммунологических показателей индуцированной мокроты у детей с бронхиальной астмой легкой степени тяжести

Я. И. Жаков, Е. Е. Минина, О. Г. Рыбакова, В. И. Куличков  
Кафедра детских болезней №1, ЧелГМА, г. Челябинск.

### The Resume

*Authors investigate immunologic factors of induced sputum in children with mild asthma. The aim of the study was to find out the differences of immunologic profiles in intermittent and persistent mild asthma. 57 children aged 6-18 years old (12±0,45) with diagnosed stable mild asthma (41 (72%) — with intermittent and 16 (28%) — with persistent mild asthma) were include in this study. Control group was 10 children without allergic diseases, which had no respiratory symptoms during last month. Sputum induction carried out according to our modification of protocol developed by Pin et al. The levels of IgE, sIgA, IgM, IgG, IL-4, IL-8, TNFα, INFγ, NO were evaluated in sputum.*