

На правах рукописи

Колобовникова Юлия Владимировна

РОЛЬ ЭОЗИНОФИЛЬНОЙ РЕАКЦИИ КРОВИ
В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

14.03.03 – патологическая физиология
03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ

Новицкий
Вячеслав Викторович

доктор медицинских наук, профессор

Уразова
Ольга Ивановна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН,
директор Научного центра клинической и экспериментальной
медицины СО РАМН

Шкурупий
Вячеслав Алексеевич

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент
РАМН, руководитель лаборатории радионуклидных методов
исследования ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН

Лишманов
Юрий Борисович

доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории патофизиологии
и экспериментальной терапии ФГБУ «НИИ фармакологии»
СО РАМН

Агафонов
Владимир Иванович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Новосибирск).

Защита состоится: «__» _____ 2013 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск, проспект Ленина, 107).

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Эозинофилия крови при туберкулезе легких (ТЛ) в большинстве случаев возникает на фоне проводимой противотуберкулезной терапии [Мишин В.Ю. и соавт., 2004; Михеева О.М. и соавт., 2010; Мордык А.В., 2010]. Лекарственная непереносимость по аллергическому типу является на сегодняшний день основанием (Приказ МЗ РФ от 21.03.2003 №109, Приложение №6 Инструкция по химиотерапии больных туберкулезом) для внесения корректив в стандартные схемы лечения пациентов с ТЛ, что неблагоприятно сказывается на течении заболевания в связи с высокой степенью изменчивости генома *Mycobacterium tuberculosis* [Сафарян М.Д., 2008; Зиновьев И.П. и соавт., 2009; Филинюк О.В., 2011]. Вместе с тем, врачи-фтизиатры констатируют случаи возникновения эозинофильной реакции крови у впервые выявленных больных ТЛ до начала лечения противотуберкулезными препаратами [Филинюк О.В., 2001; Земляная Н.А. и соавт. 2007; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Legrand F. et al., 2009; Kirman J. et al., 2009; Driss V. et al., 2012].

В 90 % случаев формирование эозинофилии крови при патологии связывают с гиперпродукцией ключевых эозинофил-активирующих медиаторов – интерлейкина (IL) 5 и эотаксинов, регулирующих гомеостаз клеток посредством связывания их со специфическими рецепторами (IL-5R и CCR3) [Wise E.L. et al., 2010; Endo Y. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012; Zafra M.P. et al., 2012].

Одним из главных факторов, определяющих функциональную активность цитокинов и их рецепторов у отдельного индивидуума, является аллельный полиморфизм генов [Rowe S.M., 2005; Кононенко В.И. и соавт., 2006; Кофиади И.А., 2006; Pullat et al., 2007; Абрамов Д.Д. и соавт., 2011]. Установлено наличие ассоциаций аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с характером экспрессии соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к определенным заболеваниям [Онищенко Г.Г. и соавт., 2008; Attab K.A., 2008; Ризванова Ф.Ф. и соавт., 2010; Шевченко А. В. и соавт., 2010; Wise E. L. et al., 2010; Zhu W. et al., 2010; Цыган В.Н. и соавт., 2011]. Так, полиморфизм *C-703T* гена *IL5*, *G-80A* гена *IL5RA*, *A-384G* гена *CCL11* и *T-51C* гена *CCR3* ассоциирован с уровнем секреции соответствующих цитокинов, экспрессией на клетках комплементарных им рецепторов и количеством эозинофилов в периферической крови [Карпова А.В., 2009; Al-Abdulhadi S.A. et al., 2010; Wang T.-N. et al., 2010; Innoue N. et al., 2011].

В настоящее время эозинофилы рассматривают в качестве полифункциональных лейкоцитов, обладающих цитотоксической и фагоцитарной активностью, а также проявляющих функции антигенраспознающих и антигенпрезентирующих клеток, способных секретировать широкий спектр

иммунорегуляторных молекул [Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Farahi N. et al., 2012; Yousefi S. et al., 2012; Feng Y.H., Mao H., 2012; Fulkerson P.C., Rothenberg M.E., 2013; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013]. Установлено, что эозинофильные гранулоциты презентуют на своей поверхности toll-подобные рецепторы (TLR), $\gamma\delta$ Т-клеточный рецептор ($\gamma\delta$ TCR), молекулы главного комплекса гистосовместимости типа II, рецепторы к цитокинам и хемокинам, молекулы адгезии и др.; секретируют свыше 35 цитокинов [Hogan S.P. et al., 2008; Speirs R.S. et al., 2009; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Xue F.M. et al., 2012; Xue F.M. et al., 2012; Reece P. et al., 2013].

При ТЛ количество эозинофильных гранулоцитов может увеличиваться не только в крови, но и в области гранулематозного воспаления [Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009; Hattori Y. et al., 2011; Driss V. et al., 2012]. Показана способность эозинофилов взаимодействовать с микобактериями различных видов (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. smegmatis*), в результате чего происходит дегрануляция клеток, высвобождение активных форм кислорода, цитотоксических протеинов и цитокинов [Lasco T.M. et al., 2004; Legrand F. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009].

Известно, что длительное присутствие эозинофильных гранулоцитов в крови и тканях может сопровождаться развитием серьезных осложнений. Весьма часто у пациентов с эозинофильной реакцией крови обнаруживаются признаки васкулита и эндомиокардиальной болезни, десквамация и деструкция бронхо-альвеолярного эпителия, повреждение и фиброзирование эпителия желудочно-кишечного тракта, замедление репаративных явлений в органах и др. [Белобородова Э.И., Колосовская Т.А., 1986; Озерецковская Н.Н., 2000; Черногорюк Г.Э., 2002; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Vaandrup U., 2012; Farahi N. et al., 2012; Fulkerson P.C., Rothenberg M.E., 2013].

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным изучение механизмов формирования эозинофильной реакции крови при ТЛ, а также оценка ключевых функций эозинофильных гранулоцитов с определением их возможного участия в реализации повреждающих и защитно-приспособительных реакций макроорганизма. Изучение влияния гемической эозинофилии на течение и исход туберкулезной инфекции позволит обосновать необходимость контроля данной гематологической реакции при ТЛ.

Цель исследования: охарактеризовать молекулярно-генетические механизмы формирования эозинофильной реакции крови и ее роль в патогенезе иммунного дисбаланса при туберкулезе легких.

Задачи исследования:

1. Оценить экспрессию рецепторов IL-5RA, CCR3 на эозинофилах и содержание

комплементарных им ключевых эозинофил-активирующих цитокинов IL-5 (в крови и культуре эозинофилов *in vitro*) и CCL11/эотаксина (в крови) у больных инфильтративным и диссеминированным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких с эозинофилией и без нее.

2. Проанализировать ассоциацию аллельных вариантов промоторных регионов *G-80A* гена *IL5RA*, *T-51C* гена *CCR3*, *C-703T* гена *IL5* и *A-384G* гена *CCL11* с экспрессией на эозинофилах соответствующих рецепторов, концентрацией цитокинов и содержанием эозинофильных гранулоцитов в крови у больных туберкулезом легких.

3. Оценить адгезивные свойства, цитотоксическую, фагоцитарную и цитокинсекреторную активность эозинофильных гранулоцитов крови у больных туберкулезом легких с эозинофилией и без нее.

4. Исследовать показатели клеточного (содержание CD3⁺ Т-лимфоцитов, IL-2 и IFN γ) и гуморального (содержание CD20⁺ В-лимфоцитов, IL-5 и IL-4) иммунитета, а также факторы иммуносупрессии (содержание регуляторных Т-клеток, IL-10 и TGF β) при туберкулезе легких в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови.

5. Оценить роль эозинофилии крови в формировании иммунопатологических и клиничко-рентгенологических проявлений туберкулеза легких с учетом формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам.

Научная новизна. Впервые у больных туберкулезом легких исследованы молекулярно-генетические механизмы эозинофильной реакции крови, формирующейся до лечения противотуберкулезными препаратами. Показано, что гемическая эозинофилия при туберкулезе легких обусловлена повышением концентрации IL-5 и CCL11 в крови, секреции IL-5 *in vitro* и гиперэкспрессией IL-5RA эозинофильными лейкоцитами. Установлена ассоциация эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких с носительством генотипов *CC* полиморфизма *C-703T* гена *IL5*, *GG* полиморфного участка *A-384G* гена *CCL11*, а также генотипа *CC* (*T-51C*) гена *CCR3*. Идентифицированы «высокопродуцирующие генотипы» *CC* (*C-703T*) гена *IL5* и *GG* (*A-384G*) гена *CCL11*, обуславливающие избыточные концентрации IL-5 и CCL11/эотаксина в крови у больных туберкулезом легких. Выявлено, что повышение количества IL-5RA⁺ эозинофилов в крови при туберкулезе легких с эозинофилией не связано с полиморфным сайтом *G-80A* гена *IL5RA*.

При изучении особенностей функциональной активности эозинофильных гранулоцитов крови показано, что у больных туберкулезом легких с эозинофилией выявляется увеличение числа эозинофилов, экспрессирующих IL-5RA, CD18 (при

нормальном количестве $CD9^+$ клеток) и CCR3 (при индукции клеток рекомбинантным IL-5). При этом активация фагоцитарной функции эозинофильных гранулоцитов крови сопряжена со снижением активности эозинофильной пероксидазы, а увеличение IL-5- и TNF α -секреторной реактивности клеток – с разнонаправленными изменениями базальной секреции IL-2 эозинофилами *in vitro* (снижение при инфильтративном и увеличение при диссеминированном туберкулезе легких).

В результате анализа показателей иммунного ответа при различных клинических формах лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови впервые установлено, что при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией крови, независимо от формы заболевания и чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам, дефицит IFN γ сочетается с повышением содержания IL-5 в крови, а также увеличением продукции мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* IL-4 и цитокинов с супрессорной активностью – IL-10 (при индукции BCG у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких) и TGF β (базальной и BCG-индуцированной). Обосновано также, что изменения цитокиновой секреции у больных с эозинофильной реакцией сопряжены с повышением содержания в крови количества $CD20^+$ В-лимфоцитов и иммуносупрессорных $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов. Выявлено, что количество $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов в крови при диссеминированном туберкулезе легких коррелирует с гиперпродукцией IL-2 эозинофилами и дефицитом его секреции (базальной и при индукции BCG) мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*, что подтверждает участие эозинофильных гранулоцитов в реализации механизмов Th1-супрессии, характерной для туберкулезной инфекции.

При исследовании клинических и рентгенологических проявлений патологического процесса в легких установлена ассоциация эозинофильной реакции крови с деструктивными изменениями и замедлением темпов рассасывания инфильтратов в легочной ткани при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких. Показана достоверная взаимосвязь между формированием очагов деструкции в легких у больных туберкулезом легких и базальной секрецией TNF α эозинофильными гранулоцитами *in vitro*.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные фундаментального характера существенно расширяют представления о роли эозинофильной реакции крови в иммунопатогенезе туберкулеза легких, механизмах формирования данной гематологической реакции и участии эозинофильных гранулоцитов в реализации повреждающих и защитно-

приспособительных реакций макроорганизма. Результаты молекулярно-генетических исследований, подтверждающих ассоциацию аллельного полиморфизма генов *IL5* и *CCL11* с содержанием соответствующих цитокинов в крови, представляются значимыми с позиции новых знаний о генетически детерминированном характере эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких. Результаты оценки цитокинсекреторной и цитотоксической активности эозинофильных гранулоцитов дополняют представления об участии данных клеток в реализации механизмов иммуносупрессии и деструкции легочной ткани при туберкулезе легких. Полученные новые данные о негативной роли эозинофильной реакции крови в иммунопатогенезе туберкулеза легких, проявляющейся дисбалансом иммунного ответа по пути доминирования Th2-реакций в условиях иммуносупрессии факторов Th1-ответа, а также отрицательной динамикой рентгенологических и клинических признаков повреждения легочной ткани, обосновывают необходимость контроля и коррекции данной гематологической реакции у больных туберкулезом легких.

Положения, выносимые на защиту:

1. Развитие эозинофилии крови при инфильтративном и диссеминированном лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких до лечения ассоциировано с повышением секреции эозинофилами IL-5 и его содержания в крови, гиперэкспрессией на эозинофилах IL-5RA, а также носительством аллеля *C* и генотипа *CC* (*C-703T*) гена *IL5*, аллеля *G* и генотипа *GG* (*A-384G*) гена *CCL11* и аллеля *C* и генотипа *CC* (*T-51C*) гена *CCR3*. При этом повышенное содержание IL-5 и CCL11/эотаксина в крови сопряжено с генотипами *CC* (*C-703T*) гена *IL5* и *GG* (*A-384G*) гена *CCL11*; увеличение числа IL-5RA⁺ эозинофилов крови не связано с полиморфным вариантом *G-80A* гена *IL5RA*.
2. Эозинофильные гранулоциты крови у больных туберкулезом легких с эозинофилией характеризуются повышенной реактивностью, о чем свидетельствует увеличение числа клеток, экспрессирующих CD18 и (при действии рекомбинантного IL-5) рецепторы IL-5RA и CCR3, базальная и BCG-индуцированная гиперсекреция IL-5, IL-2 (при диссеминированном туберкулезе легких) и TNF α *in vitro*, активация фагоцитоза в ассоциации с менее выраженным понижением активности эозинофильной пероксидазы.
3. При туберкулезе легких с эозинофилией крови иммунный дисбаланс в направлении Th2-зависимых реакций с признаками иммуносупрессии проявляется дефицитом в крови IFN γ при повышении содержания IL-5, CD20⁺ В-лимфоцитов и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клеток в сочетании с гиперсекрецией мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* IL-4 и цитокинов с Th1-супрессорной активностью – IL-10 и TGF β .

4. Ассоциация эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких (инфильтративном и диссеминированном) с деструктивными изменениями и замедлением темпов рассасывания инфильтратов в легочной ткани в сочетании с признаками Treg-опосредованной иммуносупрессии и Th1/Th2-дисбаланса обосновывает негативную роль гемической эозинофилии в патогенезе туберкулеза легких.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на IX Российско-германской научно-практической конференции им. Р. Коха и И.И. Мечникова «Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении» (Новосибирск, 2010); Всероссийской научной конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии - 2011» (Санкт-Петербург, 2011); XVII Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2011» (Санкт-Петербург, 2011); IX Съезде фтизиатров России (Москва, 2011); XI и XII Российском конгрессе молодых ученых с международным участием «Науки о человеке» (Томск, 2010, 2011); Международной интернет-конференции: «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы» (Казань, 2012); на научно-образовательных семинарах «Патофизиология системы крови и иммунитета» при Центре компетенции по проблеме инфекционных болезней им. И.И. Мечникова и Р. Коха ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2010 – 2013), на научных семинарах кафедр патофизиологии и фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2010 – 2013).

Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ (Соглашение № 13-04-01417/13 «Феномен гемической эозинофилии в патогенезе инфекционного процесса», руководитель – Ю.В. Колобовникова); Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых – кандидатов медицинских наук (Договор № 14.124.13.3383-МК «Роль эозинофильной реакции крови в патогенезе инфекционного процесса», руководитель – Ю.В. Колобовникова) и Совета по грантам Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ (НШ-614.2012.7 «Идентификация молекулярных мишеней регуляции апоптоза, пролиферации и дифференцировки клеток крови при патологии инфекционного и неинфекционного генеза», руководитель – академик РАМН В.В. Новицкий).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 299 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 58 таблицами.

Библиографический указатель включает 514 источников, из них 187 отечественных и 327 зарубежных авторов.

Внедрение. Результаты, основные положения и выводы диссертации внедрены в учебный процесс в ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России на кафедрах патофизиологии (в тематических разделах «Патофизиология системы крови», «Патофизиология иммунитета», «Воспаление»), фтизиатрии и пульмонологии (в тематических разделах «Иммунитет и аллергия при туберкулезе», «Патофизиология туберкулезного воспаления»).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 25 работ, из них 15 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Соискатель принимал непосредственное участие в разработке научной концепции, дизайна и планировании исследования, постановке его цели и задач. Автором лично выполнены все клинико-лабораторные методы исследования; получены, проанализированы и интерпретированы эмпирические данные исследования; подготовлены к публикации статьи и тезисы по теме диссертации.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика клинического материала

В основу настоящей работы положены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 217 пациентов (149 мужчин и 68 женщин) европеоидного происхождения в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст $41,94 \pm 10,63$ лет) с впервые выявленным туберкулезом легких (ТЛ), проживающих на территории г. Томска и Томской области. Пациенты находились на стационарном лечении в Томской областной туберкулезной клинической больнице (гл. врач – врач высшей категории, канд. мед. наук Г.В. Янова) во фтизиатрическом отделении №1 (зав. отд. – О.И. Новосельцева).

Диагноз ТЛ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования органов грудной клетки, результатов микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Инfiltrативный ТЛ (ИТЛ) был диагностирован у 132 (60,8 %) пациентов, диссеминированный ТЛ (ДТЛ) – у 85 (39,2 %) (табл. 1).

Возбудитель туберкулеза выявлялся методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флуорохромов (аурамина). Бактериовыделение регистрировалось в 100 % случаев заболевания. Для видовой идентификации микобактерий туберкулеза (МБТ) и определения их чувствительности к противотуберкулезным препаратам (методом абсолютных

концентраций) производился посев мокроты на плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финн-2. Исследования выполнялись в бактериологических лабораториях Томской областной туберкулезной клинической больницы (гл. врач – врач высшей категории, канд. мед. наук Г.В. Янова) и Томского областного противотуберкулезного диспансера (гл. врач – главный фтизиатр Томской области, врач высшей категории С.П. Мишустин).

Таблица 1

Распределение больных туберкулезом легких по группам исследования

Принципы распределения больных туберкулезом легких на группы исследования		С эозинофилией	Без эозинофилии	Всего
Всего пациентов		102	115	217
По клинической форме заболевания	Инфильтративный	62	70	132
	Диссеминированный	40	45	85
По чувствительности возбудителя к основным ПТП	Лекарственно-чувствительный	43	56	99
	Лекарственно-устойчивый	35	23	58

Примечание: ПТП – противотуберкулезные препараты.

У 157 обследованных больных ТЛ (94 больных ИТЛ и 63 больных ДТЛ) была определена лекарственная чувствительность возбудителя к основным противотуберкулезным препаратам (ПТП). По данному критерию было выявлено 99 пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, и 58 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда (изониазиду, рифампицину и стрептомицину).

Контрольную группу составили 120 здоровых доноров (91 мужчина и 29 женщин), сопоставимых по возрасту, не имеющих в анамнезе соматических заболеваний и аллергических реакций, заболеваемость которых острыми респираторными инфекциями составляла не чаще 2 – 3 раз в год.

Все пациенты с ТЛ были обследованы при поступлении на стационарное лечение до назначения терапии.

Критерием включения в исследование было наличие у впервые выявленных больных инфильтративного и диссеминированного ТЛ.

Учитывая то, что эозинофильная реакция крови сопровождается аллергические заболевания и паразитарные инвазии, в исследование не включались больные, имеющие в анамнезе аллергические заболевания, отягощенную наследственность, лекарственную и пищевую аллергию. Всем обследованным лицам проводился

иммуноферментный анализ (ИФА) с целью выявления диагностически значимых титров антител к антигенам гельминтов, в отдельных случаях отсутствие паразитоза подтверждалось копроовоскопически.

В связи с запланированным дизайном исследования оценка ассоциаций носительства аллельного полиморфизма генов с изменением цитокинопродукции и экспрессии рецепторов на мембране клеток *in vitro* проводилась на примере двух общих групп больных ТЛ с эозинофилией (102 человека) и без эозинофилии (115 человек).

Исследование функциональной активности эозинофильных гранулоцитов и роли гемической эозинофилии в патогенезе туберкулезной инфекции у больных ТЛ проводилось с учетом эозинофилии крови, формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП: среди больных ТЛ с эозинофилией (62 пациента с ИТЛ и 40 – с ДТЛ), среди больных ТЛ без эозинофилии (70 пациентов с ИТЛ и 45 – с ДТЛ); по лекарственной чувствительности возбудителя к основным ПТП (среди больных ТЛ с эозинофилией (43 пациента, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, и 35 пациентов, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда), среди больных ТЛ без эозинофилии (56 пациентов, выделяющих МБТ, чувствительные к основным ПТП, и 23 пациента, выделяющих МБТ, устойчивые к препаратам основного ряда) (табл. 1).

Материал исследования

Материалом исследования являлась венозная кровь, взятая у здоровых доноров и у больных ТЛ до назначения специфической химиотерапии, а также супернатанты культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов крови. Кровь забирали утром натощак из локтевой вены в количестве 20 мл. Исследования проводились в Центральной научно-исследовательской лаборатории (зав. – д-р мед. наук, профессор А.Н. Байков) и в лаборатории клинической и экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Методы исследования

- Выделение эозинофильных гранулоцитов из цельной крови по методу I. Gartner [1980].
- Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови по методу A. Boyum [1968].
- Определение концентрации IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , TNF α , TGF β и CCL11 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем

(ЗАО «Вектор-Бест», Россия, ООО «Протеиновый контур», Россия, «Biosource», США, «Bender Medsystems» США, «BCM Diagnostics», США).

- Определение поверхностных рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксину (CCR3), молекул адгезии (CD9 и CD18) на эозинофильных гранулоцитах методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками, согласно протоколам фирм-производителей («R&D Systems» и «Caltag Laboratories», США).
- Выделение ДНК из периферической крови сорбентным методом, согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия).
- Исследование полиморфных участков генов цитокинов и их рецепторов с использованием рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома (ПДРФ-анализ) [Fukunaga K., 2001; Фрейдин М.Б., 2002; Tsunemi Y., 2002].
- Определение фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов, согласно инструкции, прилагаемой производителем тест-системы PHAGOTEST («Glycotope Biotechnology GmbH», Германия).
- Определение активности эозинофильной пероксидазы по методу E. Sato в модификации D. Quaglino [1967].
- Определение белка микробиуретовым методом.
- Определение поверхностных молекул CD3 и CD20 на лимфоцитах периферической крови методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием МКАТ (ООО «Сорбент», Россия).
- Определение поверхностных молекул CD4, CD25 и внутриклеточного маркера иммуносупрессорной активности *Foxp3* в лимфоцитах периферической крови методом проточной цитометрии с использованием МКАТ, меченных флуоресцентными метками («Becton Dickinson (BD)», США).
- Определение в крови концентрации суммарных антител к антигенам *Mycobacterium tuberculosis* методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), согласно инструкции, предлагаемой производителем тест-системы (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).
- Статистический анализ результатов исследования.

Анализ первичных данных проводили с применением методов статистического описания и проверки статистических гипотез. Все количественные показатели проверяли на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для нормально распределенных выборок вычисляли средневыборочные характеристики: среднее арифметическое (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибку среднего (m). Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (M),

первый и третий квартили (Q_1 , Q_3). Для показателей, характеризующих качественные признаки, вычисляли W – выборочные доли и S_w – среднюю ошибку выборки для доли (%). Проверку гипотезы о равенстве долей в двух исследуемых выборках проводили методом угловой трансформации, основанной на ϕ -преобразовании Фишера. При соответствии количественного признака в исследуемых выборках нормальному закону распределения проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t -критерия Стьюдента, не подчиняющихся нормальному распределению – с применением U -критерия Манна-Уитни (для независимых групп). Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Лакин Г.Ф., 1980].

С целью выявления функциональных взаимосвязей между параметрами применяли корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Для анализа связи между качественными признаками использовался бисериальный коэффициент корреляции и коэффициент ассоциации (r_a). При значениях коэффициента корреляции (коэффициента ассоциации) меньше 0,5 связь считалась сомнительной, от 0,5 до 0,75 – достаточной, более 0,75 – высокой [Боровиков В.П., 2003].

Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного теста Фишера. Для сравнения частот аллелей между различными группами использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Обработка результатов генетических исследований осуществлялась с использованием критерия отношения шансов OR с расчетом для него 95 % доверительного интервала [Флейс Дж., 1989].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярно-генетический механизм формирования эозинофилии крови при туберкулезе легких

Эозинофилию крови при туберкулезе легких в большинстве случаев расценивают как побочный эффект проводимой противотуберкулезной терапии [Мишин В.Ю. и соавт., 2004; Мордык А.В., 2010]. Согласно данным анализа медицинских карт пациентов, находящихся на стационарном лечении в Томской областной туберкулезной клинической больнице (гл. врач – врач высшей категории, канд. мед. наук Г.В. Янова) во фтизиатерапевтическом отделении №1 (зав. отд. – О.И. Новосельцева) в период с 2009 по 2012 гг., эозинофильная реакция крови регистрировалась у 30 % пациентов с ТЛ на фоне приема ПТП основного (первого) ряда (изониазид, рифампицин, стрептомицин, пипразинамид и этамбутол).

Наряду с лекарственной эозинофилией нередко случаи повышенного содержания эозинофилов в периферической крови у больных ТЛ до проведения специфической химиотерапии [Филинюк О.В., 2001; Земляная Н.А. и соавт. 2007; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Legrand F. et al., 2009; Kirman J. et al., 2009]. По результатам настоящего исследования, умеренная эозинофилия крови (абсолютное содержание эозинофилов $(0,966 \pm 0,110) \times 10^9/\text{л}$) была зарегистрирована у 18 % больных с впервые выявленным ТЛ до назначения ПТП (по результатам анализа медицинских карт пациентов фтизиатерапевтического отделения №1 Томской областной туберкулезной клинической больницы (2009-2012 гг.)). Максимальное увеличение абсолютного числа эозинофилов (до $1,140 \times 10^9/\text{л}$) было зарегистрировано у больных с диссеминированной формой ТЛ.

Изучение молекулярных механизмов формирования гемической эозинофилии при патологии, в том числе при ТЛ, предполагает оценку ключевых цитокинов, модулирующих основные функции эозинофильных гранулоцитов: IL-5 и эотаксинов. Эти медиаторы регулируют процессы пролиферации и дифференцировки эозинофилов, ингибируют апоптоз данных клеток, опосредуют реализацию ими эффекторных и иммунорегуляторных свойств [Rothenberg M.E. et al., 2007; Paplinska M. et al., 2007; Manqieri D. et al., 2012; Morshed M. et al., 2012].

При анализе содержания IL-5 (ключевого эозинофилопоэтина) в крови его увеличение было установлено только у пациентов с инфильтративным ТЛ (ИТЛ) и диссеминированным ТЛ (ДТЛ) в сочетании с эозинофилией, тогда как уровень IL-5 в крови у пациентов с ТЛ без эозинофилии не отличался от контрольных значений (табл. 2).

Среди больных ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, максимальное значение содержания IL-5 в крови отмечалось при лекарственно-устойчивом (ЛУ) варианте инфекции (71,52 (56,73-77,32) пг/мл, $p_4 < 0,05$).

Определяющая роль IL-5 в механизмах формирования эозинофилии крови у больных ТЛ подтверждалась наличием положительной корреляции между концентрацией IL-5 и абсолютным количеством эозинофильных гранулоцитов в крови при ДТЛ ($r=0,81$, $p < 0,05$).

Для уточнения вклада эозинофилов в механизм формирования эозинофилии крови при ТЛ в ходе исследования оценивалась способность этих клеток секретировать IL-5. Как показали результаты исследований, содержание IL-5 в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов оказалось повышенным лишь у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови. Это подтверждает способность эозинофилов к аутокринной стимуляции эозинофилами собственной активности, эозинофилопоэза и пролонгированного пребывания в кровотоке.

Таблица 2

Содержание IL-5 и CCL11/эотаксина в крови (пг/мл) у больных
туберкулезом легких (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IL-5	CCL11
Здоровые доноры		8,99 (7,56-19,44)	25,19 (18,27-34,31)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	52,96 (35,65-69,81) $p_1 < 0,05$	42,52 (26,09-51,38) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	64,02 (38,09-75,18) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	51,08 (41,78-56,49) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	10,80 (8,64-13,73) $p_2 < 0,05$	28,21 (25,37-37,96) $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	8,22 (7,31-10,81) $p_2 < 0,05$	31,56 (29,45-43,51) $p_2 < 0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p_3 – у больных инфильтративным туберкулезом легких.

Реактивный характер эозинофилии крови при ТЛ подтверждается также результатами количественной оценки другого эозинофил-активирующего медиатора – CCL11 (белок подсемейства эотаксинов). В ходе настоящего исследования было зарегистрировано достоверное повышение содержания CCL11/эотаксина в крови только у больных ТЛ с эозинофилией (табл. 2). Обращал на себя внимание высокий уровень CCL11/эотаксина в крови у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, выделяющих лекарственно-резистентные штаммы МБТ (54,32 (44,92-67,32) пг/мл при ЛУ ИТЛ с эозинофилией ($p_4 < 0,05$) и 58,09 (44,12-62,40) пг/мл при ЛУ ДТЛ с эозинофилией ($p_4 < 0,05$)). Одним из возможных механизмов избыточного содержания CCL11/эотаксина в крови у больных ТЛ, на наш взгляд, может быть опосредованное влияние Th2-цитокинов (в избытке секретируемых при ЛУ ТЛ), которые стимулируют экспрессию мРНК эотаксинов в эндотелиальных и эпителиальных клетках, а также в фибробластах. Кроме этого, при ТЛ с эозинофилией высокий уровень CCL11/эотаксина в крови мог быть результатом выраженной секреторной активности самих эозинофильных гранулоцитов.

Известно, что цитокины реализуют свои эффекты при взаимодействии со специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней. При исследовании механизмов формирования гемической эозинофилии несомненный интерес представляет оценка экспрессии рецепторов для эозинофил-специфичных

цитокинов (IL-5 и CCL11/эотаксина), нарушения которой могут являться еще одним механизмом увеличения количества эозинофилов в периферической крови при ТЛ.

С использованием метода проточной цитометрии в условиях *in vitro* нами была проведена оценка экспрессии на эозинофилах, выделенных из крови больных ТЛ с эозинофилией и без таковой, α -субъединицы мембраносвязанной формы рецептора к IL-5 (IL-5RA/CD125) и рецептора к эотаксину (CCR3). В результате было показано достоверное повышение количества эозинофилов, несущих IL-5RA, в интактной культуре клеток у больных с эозинофилией (ИТЛ - 20,86 (16,20-23,35) % и ДТЛ - 24,61 (9,89-29,32) %), что может быть опосредовано, на наш взгляд, влиянием одноименного медиатора, избыточные концентрации которого идентифицированы в крови у пациентов данных групп наблюдения. Обращал на себя внимание также установленный нами факт положительной корреляции между содержанием IL-5 и IL-5RA-позитивных клеток в крови у пациентов с ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией ($r=0,73$, $p<0,05$).

При добавлении в культуру клеток рекомбинантного IL-5 (rIL-5) повышение содержания IL-5RA⁺ эозинофилов относительно контрольных значений устанавливалось у больных ТЛ с эозинофилией. При определении соотношения числа клеток, несущих IL-5RA, в базальной и rIL-5-индуцированной культурах эозинофилов было показано увеличение индекса стимуляции рецепторной экспрессии у больных ИТЛ с эозинофилией и без нее. Данное обстоятельство позволяет думать о том, что гиперэкспрессия эозинофилами IL-5RA может быть как следствием повышения концентрации IL-5 в крови, так и одной из причин повышенной чувствительности клеток к IL-5 при туберкулезной инфекции.

При оценке содержания CCR3⁺ клеток в интактной культуре эозинофильных лейкоцитов *in vitro* было зарегистрировано увеличение их количества только у больных ИТЛ (36,63 (23,36-47,28) %) и ДТЛ (45,99 (35,31-72,42) %) без эозинофилии. Гиперэкспрессия эозинофилами CCR3 в сочетании с нормальным уровнем CCL11/эотаксина в крови у больных ТЛ без эозинофилии указывает на ключевую роль комплекса «эотаксин-CCR3» в механизмах рекрутирования эозинофилов в зону гранулематозного воспаления. В свою очередь, нормальный уровень клеток, несущих CCR3, в культуре эозинофилов *in vitro* на фоне высокого содержания CCL11/эотаксина в крови при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, вероятно, в большей степени отражает предрасположенность к длительному пребыванию клеток в кровотоке, опосредованному гиперсекрецией IL-5 – ключевого эозинофил-активирующего фактора. В то же время, при анализе результатов оценки содержания клеток в культуре эозинофильных гранулоцитов *in vitro*, инкубированных с rIL-5, было установлено достоверное повышение

количества CCR3-позитивных эозинофилов относительно их числа в интактной культуре. Это подтверждает способность IL-5 увеличивать пул клеток, несущих CCR3 и праймировать эозинофилы в отношении этого лиганда [Zimmermann N. et al., 2003]. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении резерва рецептор-экспрессирующей способности эозинофильных гранулоцитов у больных ТЛ.

Проведенный анализ позволяет заключить, что повышенное содержание CCL11/эотаксина, IL-5 и IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в периферической крови является ключевым фактором гемической эозинофилии при ТЛ. Основной хематтрактант эозинофильных гранулоцитов CCL11/эотаксин в сочетании с профицитом IL-5 выступает в роли фактора активации клеток, обуславливая избыток эозинофильных лейкоцитов в периферической крови при туберкулезной инфекции.

Анализируя возможные причины повышения концентрации IL-5 и CCL11/эотаксина в крови и содержания IL-5RA⁺ и CCR3⁺ эозинофилов при ТЛ, необходимо учитывать генетически детерминированный характер секреции медиаторов клетками и экспрессии ими рецепторных структур. В литературе представлены данные о наличии взаимосвязей аллельного полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов с характером экспрессии кодируемых ими белковых продуктов и вероятностью развития определенных болезней [Sehmi R., 1997; Фрейдин М.Б. и соавт., 2004; Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J.H. et al., 2007].

В результате настоящего исследования было установлено, что у больных ТЛ с эозинофилией распределение аллелей и генотипов полиморфных сайтов генов исследуемых цитокинов и их рецепторов значимо отличалось от такового у здоровых доноров и у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 3).

Так, в промоторной области гена *IL5* идентифицирован полиморфный участок в положении -703, замена цитозина на тимин (C-703T) в котором оказывает влияние на уровень секреции белкового продукта. В ходе настоящего исследования у больных ТЛ было установлено изменение распределения аллельных вариантов полиморфизма C-703T гена *IL5*, что выразалось в преобладании гомозиготного генотипа *CC* над гетерозиготным *CT* и гомозиготным *TT* генотипами. При статистическом анализе были получены значимые различия в распределении генотипов (C-703T) гена *IL5* между здоровыми донорами и больными ТЛ с эозинофилией и без нее (табл. 3).

Исследование распределения аллелей и генотипов полиморфизма C-703T гена *IL5* позволило установить при ТЛ положительную ассоциацию гомозиготного генотипа *CC*, а также аллеля *C* с эозинофилией крови и,

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов (% (абс.)) у больных туберкулезом легких

Поли-морфизм	Генотипы и аллели	Здоровые доноры, n=120	Больные туберкулезом легких с эозинофилией, n=102	χ^2	Больные туберкулезом легких без эозинофилии, n=115	χ^2
C-703T гена IL5	CC	49,2% (59)	67,6% (69)	10,37 $p_1 < 0,05$	50,4% (58)	3,31 $p_1 > 0,05$ 6,61 $p_2 < 0,05$
	CT	44,2% (53)	23,5% (24)		36,5% (42)	
	TT	6,7% (8)	8,8% (9)		13,0% (15)	
	C	71,3%	79,4%	3,92 $p_1 = 0,05$	68,7%	0,36 $p_1 > 0,05$ 6,41 $p_2 < 0,05$
	T	28,8%	20,6%		31,3%	
G-80A гена IL5RA	GG	52,5% (63)	54,9% (56)	4,38 $p_1 > 0,05$	57,4% (66)	0,91 $p_1 > 0,05$ 2,21 $p_2 > 0,05$
	GA	42,5% (51)	33,3% (34)		36,5% (42)	
	AA	5,0% (6)	11,8% (12)		6,1% (7)	
	G	73,75%	71,6%	0,26 $p_1 > 0,05$	75,7%	0,22 $p_1 > 0,05$ 0,93 $p_2 > 0,05$
	A	26,25%	28,4%		24,3%	
A-384G гена CCL11	AA	58,3% (70)	44,1% (45)	10,18 $p_1 < 0,01$	51,3% (59)	2,12 $p_1 > 0,05$ 3,33 $p_2 > 0,05$
	AG	32,5% (39)	31,4% (32)		33,9% (39)	
	GG	9,2% (11)	24,5% (25)		14,8% (17)	
	A	74,6%	59,8%	11,03 $p_1 < 0,001$	68,3%	2,30 $p_1 > 0,05$ 3,37 $p_2 > 0,05$
	G	25,4%	40,2%		31,7%	
T-51C гена CCR3	TT	51,7% (62)	42,2% (43)	6,10 $p_1 = 0,05$	56,5% (65)	0,94 $p_1 > 0,05$ 10,85 $p_2 < 0,01$
	TC	34,2% (41)	30,4% (31)		33,1% (38)	
	CC	14,2% (17)	27,5% (28)		10,4% (12)	
	T	68,8%	57,4%	6,18 $p_1 = 0,01$	73,0%	1,05 $p_1 > 0,05$ 11,81 $p_2 < 0,001$
	C	31,2%	42,6%		27,0%	

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией.

соответственно, протективный в отношении эозинофилии эффект генотипов *CT* и *TT*, а также аллеля *T* (рис. 1).

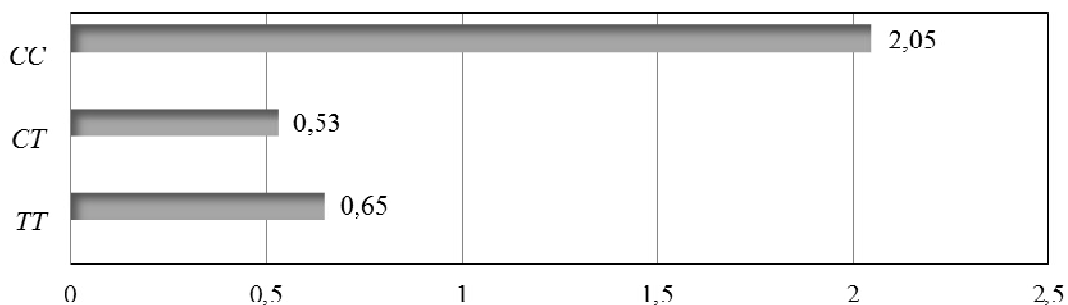


Рис. 1. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5*. Слева – генотипы полиморфного сайта *C-703T*, справа – значения критерия отношения шансов (OR)

Анализ зависимости концентрации ИЛ-5 в крови от варианта полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5* показал, что у индивидуумов с генотипом *CC* (*C-703T*) гена *IL5* содержание ИЛ-5 в крови значительно превышало таковое у пациентов с генотипами *CT* и *TT*. Таким образом, идентифицирован «высокородуцирующий» генотип *CC* полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5*, ассоциированный с высоким содержанием ИЛ-5 в крови у больных ТЛ.

Как упоминалось ранее, действие ИЛ-5 реализуется посредством связывания со специфическим рецептором ИЛ-5RA. При исследовании полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA* не было выявлено существенных различий в распределении аллелей и генотипов у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой относительно аналогичных параметров у здоровых доноров, а также при сравнении групп больных ТЛ в зависимости от числа эозинофильных гранулоцитов в крови (табл. 3). Анализ зависимости содержания ИЛ-5RA⁺ эозинофилов от варианта полиморфного сайта *G-80A* соответствующего гена также не выявил каких-либо достоверных различий у больных ТЛ – носителей разных генотипов. По всей видимости, увеличение числа эозинофилов, несущих на своей поверхности ИЛ-5RA, у больных ТЛ с эозинофилией не зависит от полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA*, а является результатом активирующего влияния одноименного цитокина, присутствующего в крови у пациентов в избыточных концентрациях.

Другим фактором, обуславливающим развитие эозинофилии крови, является *CCL11/эотаксин*. Замена аденина на гуанин в положении *-384* промотора гена *CCL11* ассоциирована с высокой концентрацией кодируемого хемокина при бронхиальной астме [Wang T.-N. et al., 2007; 2010]. В ходе проведенного нами иммуногенетического исследования полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* было установлено, что среди пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови,

достоверно чаще встречались носители гомозиготного генотипа *AA*, реже – носители гомозиготного генотипа *GG* (табл. 3). Выявлены статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов (*A-384G*) гена *CCL11* у больных ТЛ с эозинофилией и у здоровых доноров. Обнаружена положительная ассоциация аллеля *G* и генотипа *GG* (*A-384G*) гена *CCL11* с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, что свидетельствует о предрасполагающем влиянии данного полиморфизма к формированию эозинофилии крови при туберкулезной инфекции (рис. 2).

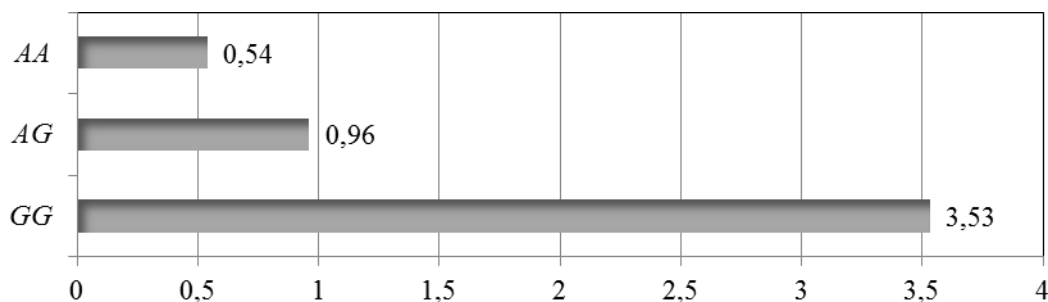


Рис. 2. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа локуса *A-384 G* гена *CCL11*. Слева – генотипы полиморфного сайта *A-384 G*, справа – критерий отношения шансов (*OR*)

При анализе содержания *CCL11*/эотаксина в крови в зависимости от аллельных вариантов полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* у больных ТЛ с эозинофилией было показано, что у гомозигот по аллелю *G* отмечался максимальный, а у гомозигот по аллелю *A* и гетерозигот *AG* – минимальный уровень секреции эотаксина-1 (табл. 3). Следовательно, наличие у больного ТЛ генотипа *GG* исследуемого полиморфного сайта *A-384G* гена *CCL11* в ассоциации с высокой концентрацией *CCL11*/эотаксина в крови может лежать в основе развития эозинофилии крови при туберкулезной инфекции.

Биологическая роль *CCL11*/эотаксина осуществляется при взаимодействии со специфическим рецептором *CCR3*, экспрессированным на эозинофильных гранулоцитах. При статистическом анализе установлены значимые различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного сайта *T-51C* гена *CCR3* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и без таковой (табл. 3).

Выявлена ассоциация аллеля *C* и генотипа *CC* (*OR*=3,25) полиморфизма *T-51C* гена *CCR3* с развитием эозинофильной реакции крови при ТЛ и, соответственно, протективный эффект генотипов *TC* (*OR*=0,88), *TT* (*OR*=0,56) и аллеля *T* полиморфизма *T-51C* гена *CCR3*.

При исследовании зависимости содержания *CCR3*-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови от варианта полиморфного сайта *T-51C* соответствующего гена не было выявлено каких-либо достоверных различий у

больных ТЛ – носителей разных генотипов. Следовательно, аллельный полиморфизм *T-51C* гена *CCR3* не оказывает существенного влияния на уровень экспрессии рецептора к эотаксинам.

Резюмируя вышеизложенное, следует заключить, что генетически детерминированная гиперсекреция ключевых факторов, активирующих эозинофильные гранулоциты - IL-5 и CCL11/эотаксина, обуславливает формирование эозинофильной реакции крови у пациентов с ТЛ. Риск развития эозинофилии повышается при сочетании в геноме больного ТЛ нескольких «высокопродуцирующих» генотипов полиморфизмов *C-703T* гена *IL5* и *A-384G* гена *CCL11*.

Особенности функциональной активности эозинофильных гранулоцитов крови при туберкулезе легких

При ТЛ эозинофильные гранулоциты могут циркулировать (в избытке) не только в периферической крови, но и участвовать (наряду с макрофагами и лимфоцитами) в формировании туберкулезной гранулемы. На моделях лабораторных животных продемонстрировано привлечение эозинофилов в очаг гранулематозного воспаления, вызванного *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. smegmatis* [Lasco T.M. et al., 2004; Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009; Nattori Y. et al., 2011]. Тем не менее, до настоящего времени остается актуальным вопрос, способствуют эозинофильные гранулоциты иммунной защите макроорганизма от МБТ или, напротив, служат дополнительным резервуаром персистенции инфекта и участником деструктивных изменений в ткани легких?

Эозинофилы - агрессивные эффекторные клетки воспаления, реализующие свои функции, главным образом, в очаге воспаления, куда они мигрируют при участии хемокинов и молекул адгезии. Посредством адгезивных молекул (селективных рецепторов) происходит начальное прикрепление к эндотелию и «роллинг» эозинофилов *in vivo* [Wardlaw A.J., 1999]. Прочная адгезия и миграция эозинофилов через стенку сосуда обеспечиваются кооперацией молекул адгезии семейства β_2 -интегринов (CD11a/CD18 (Mac-1) и CD11b/CD18 (LFA-1)), β_1 -интегринов (VLA-4) и семейства тетраспанинов (CD9), экспрессируемых на мембране эозинофилов, и молекул VCAM-1, MAdCAM-1 и ICAM-1, 2, 3, представленных на эндотелиальных клетках [Kunkel E.J., Butcher E.C., 2002; Hogan S.P. et al., 2004; Curran C.S., Bertics P.J., 2012].

Проведенное нами *in vitro* исследование уровня экспрессии адгезивных молекул CD9 (обеспечивают адгезию эозинофилов к фибронектину) и CD18 (общая субъединица Mac-1, LFA-1 и CR4) на эозинофилах, выделенных из крови больных ТЛ, позволило констатировать достоверное увеличение содержания

CD18-позитивных клеток у больных ТЛ с эозинофилией и без нее; количество CD9⁺ эозинофилов во всех группах пациентов соответствовало контрольным значениям. При ТЛ с эозинофилией количество CD18-презентирующих эозинофилов увеличивалось (до 21,54 (19,49-24,36) % при ИТЛ и 20,40 (18,50-27,31) % при ДТЛ) по сравнению с аналогичными параметрами у больных ТЛ без эозинофилии (рис. 3).

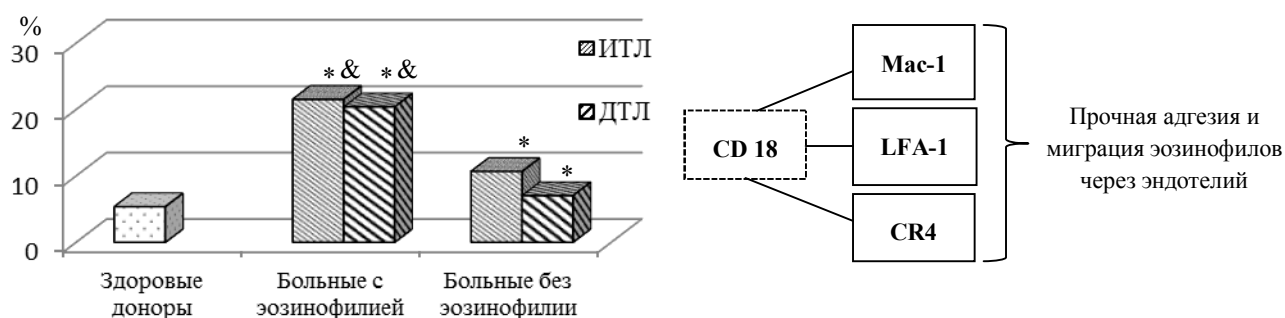


Рис. 3. Содержание CD18⁺ клеток в культуре эозинофилов *in vitro* у больных туберкулезом легких

Это может быть связано со способностью IL-5 усиливать экспрессию на мембране эозинофилов молекул адгезии Mac-1 и LFA-1, имеющих общую субъединицу CD18. Существование взаимосвязи изученных показателей подтверждалось наличием положительной корреляционной зависимости между уровнем базальной продукции эозинофильными гранулоцитами IL-5 и количеством CD18⁺ клеток у больных ДТЛ с эозинофилией ($r=0,79$, $p<0,05$).

Дальнейшее привлечение эозинофилов в очаг воспаления осуществляется при участии хемокинов и экспрессии соответствующих рецепторов. Как упоминалось ранее, специфическими хематрактантами эозинофилов принято считать эотаксины [Nagase H. et al., 2000; Oliveira S.H. et al., 2002]; выраженной хемотаксической активностью обладает также IL-5 [Wise E.L. et al., 2010; Kusano S. et al., 2012].

Активирующее влияние IL-5 в отношении экспрессии рецепторов хемотаксиса эозинофильных гранулоцитов было продемонстрировано в ходе настоящего исследования. При ТЛ с эозинофилией было установлено достоверное повышение содержания CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов при добавлении рекомбинантного IL-5 (относительно их количества в интактной культуре) при одновременном увеличении пула эозинофильных клеток, несущих IL-5RA. Выявленные изменения в сочетании с высоким содержанием IL-5 и CCL11/эотаксина в крови указывают на то, что эозинофилы при ТЛ, сопровождающемся эозинофилией, находятся в состоянии активации. Нормальный уровень экспрессии CCR3 клетками в интактной культуре

эозинофильных гранулоцитов у больных ТЛ с эозинофилией не исключает возможность хемотаксиса клеток в очаг воспаления за счет функционирования других хемокиновых рецепторов. Эозинофильные лейкоциты несут на своей мембране рецепторы для MCP и RANTES, опосредующие хемотаксис; рецепторы для PAF, при участии которого повышается экспрессия молекул CD9, играющих важную роль в агрегации и адгезии эозинофилов [Nosoki K. et al., 2012].

Экспрессия рецепторных структур, обеспечивающих процессы активации, адгезии и хемотаксиса эозинофильных клеток, обуславливает их дальнейшую аккумуляцию в очаге воспаления, вызванного *M. tuberculosis*, с последующей реализацией своего агрессивного цитотоксического потенциала, действие которого может быть направлено как в отношении бактерий, так и ткани легкого.

Цитотоксическая функция эозинофилов осуществляется за счет катионных протеинов гранул, а также метаболитов кислорода и азота, выделяемых при дегрануляции клеток [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Ярилин А.А, 2010].

Ключевую роль в реализации антибактериальных свойств эозинофилов играет эозинофильная пероксидаза (ЕРО), которая при участии перекиси водорода, галогенидов (бромид, хлорид или иодид) и псевдогалогенидов (тиоционат) опосредует образование высокореактивных продуктов, взаимодействующих с тиоловыми группами клеточной стенки бактерий, что приводит к усилению ее проницаемости [Воробьев А.И., 2003; Wang J., Slungaard A., 2006; Hogan S.P. et al., 2008]. В эксперименте F. Legrand et al. [2009] продемонстрировано, что при взаимодействии эозинофильных гранулоцитов с *M. tuberculosis*, клетки выделяют α -дефензины и ЕРО, опосредующие лизис бактерий. В состав первичных гранул эозинофилов входит миелопероксидаза - фермент, катализирующий образование хлорноватистой кислоты и других агентов, угнетающих жизнедеятельность многих бактерий [Borelli V. et al., 1999, 2003].

В настоящем исследовании мы оценивали активность пероксидазы (ЕРО и миелопероксидазы) в лизате эозинофильных гранулоцитов, выделенных из крови больных ТЛ. У всех пациентов независимо от наличия эозинофилии крови регистрировалось снижение пероксидазной активности эозинофилов по сравнению с нормой (рис. 4).

Данные изменения, на наш взгляд, могут являться следствием усиления дегрануляционной активности клеток, обладающих повышенной чувствительностью ко многим сигналам, либо результатом ускоренной мобилизации эозинофильных гранулоцитов из костного мозга с преобладанием в крови пула молодых форм клеток, характеризующихся энзиматической незрелостью. Вместе с тем, снижение активности пероксидазы в эозинофильных

гранулоцитах может быть отражением угнетения их цитотоксической функции, реализуемой в отношении *M. tuberculosis*.

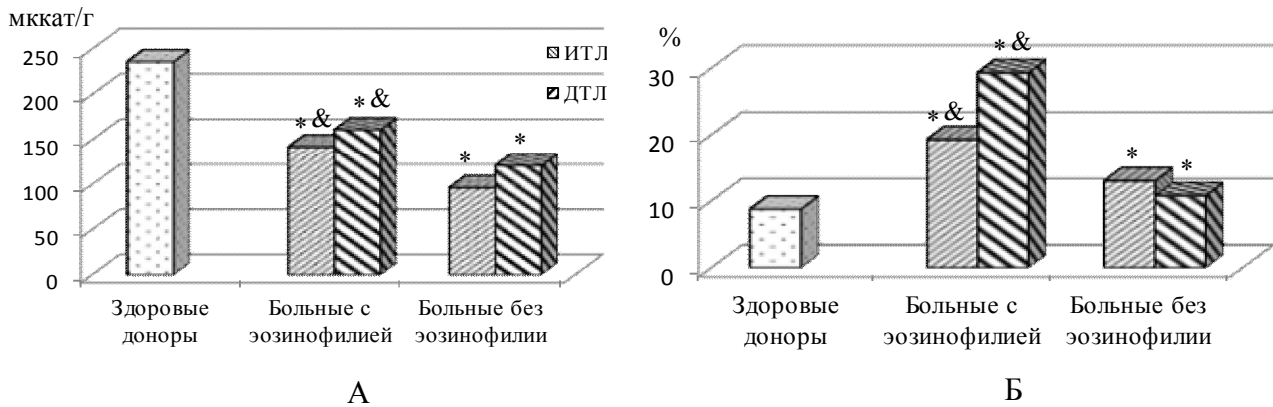


Рис. 4. Активность пероксидазы (А) и фагоцитарная активность (Б) эозинофильных гранулоцитов при туберкулезе легких

Следует отметить, что при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, снижение активности пероксидазы в эозинофилах носило менее выраженный характер по сравнению с таковым у больных ТЛ без эозинофилии (рис. 4). По-видимому, в условиях длительного активирующего влияния ИЛ-5, концентрация которого была повышенной в крови и супернатантах культуральных суспензий клеток у пациентов данной группы, в эозинофильных гранулоцитах может происходить наработка пероксидазы *de novo*.

Наряду с выделением пероксидазы и токсических метаболитов кислорода в межклеточное пространство эозинофилы способны уничтожить патоген в процессе фагоцитоза [Cherny V.V. et al., 2001]. Эозинофильные гранулоциты являются микрофагами, которые мигрируют из циркуляции в очаг воспаления, где поглощают гранулы тучных клеток, иммунные комплексы, бактерии и др. [Park Y.M., Vochnner B.S., 2010]. После поглощения объекта происходит активация гексозомонофосфатного шунта, генерирующего восстановленный NADP, с последующим образованием супероксидных и нитроксидных радикалов, которые инициируют процессы перекисного окисления мембранных липидов клеточной стенки микроорганизмов [Lacy P. et al., 2003]. Имеются отдельные сообщения о способности эозинофилов осуществлять активное поглощение вирулентных и авирулентных штаммов *M. tuberculosis* и *M. bovis in vitro* [Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009].

В ходе настоящего исследования мы оценивали фагоцитарную активность клеток в культуре эозинофилов *in vitro* по способности поглощать *E. coli*, меченные флуоресцентной меткой FITC. У всех больных ТЛ независимо от количества эозинофилов в крови, формы заболевания и чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам было зарегистрировано увеличение числа

фагоцитирующих эозинофилов (рис. 4). Примечательно, что у больных ТЛ с эозинофилией содержание фагоцитирующих клеток достоверно превышало их уровень у больных, в крови которых количество эозинофилов соответствовало норме. Выявленные изменения могут быть следствием активирующего влияния IL-5 и CCL11/эотаксина, способных усиливать экспрессию на мембране эозинофилов молекул адгезии, опосредовать их хемотаксис и поглощение патогена с последующим выбросом протеолитических ферментов в фагосому и во внеклеточное пространство. Подтверждением этому явилась положительная корреляционная зависимость между содержанием CCL11/эотаксина в крови и количеством эозинофилов, фагоцитировавших бактерии, при ДТЛ с эозинофилией ($r=0,89$, $p<0,05$). Одновременно с этим была установлена положительная корреляционная связь между количеством CD18⁺ клеток и числом фагоцитирующих эозинофилов ($r=0,67$, $p<0,05$) при ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией.

Согласно современным представлениям, эозинофильные гранулоциты реализуют не только эффекторные функции в патогенезе многих защитно-приспособительных реакций макроорганизма, но и проявляют регуляторную активность [Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Speirs R.S. et al., 2009; Akuthota P. et al., 2013; Reese P. et al., 2013]. В экспериментах продемонстрирована антигенраспознающая их функция. На мембране эозинофилов идентифицированы паттерн-распознающие структуры типа TLR2 и комплекс $\gamma\delta$ TCR-CD3, связывающие небелковые антигенные детерминанты, что позволяет эозинофилам реализовывать свои потенции на этапе доиммунных реакций [Legrand F. et al., 2009; Reese P. et al., 2013]. По данным некоторых авторов, эозинофилы способны также осуществлять процессинг и презентацию антигенов клеткам иммунной системы и тем самым проявлять антигенпредставляющую функцию [Shi H., 2005].

Наряду с этим, эозинофильные гранулоциты продуцируют цитокины с провоспалительной (IL-2, IL-12, IL-17A, IFN γ , TNF α), противовоспалительной (IL-4, IL-5, IL-13) и иммуносупрессорной (IL-10, TGF β) активностью, участвующие в реализации и регуляции иммунного ответа макроорганизма [Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Xue F.M. et al., 2012; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013].

В связи с этим, в настоящем исследовании проводилась оценка концентрации некоторых иммунорегуляторных медиаторов в интактной культуре эозинофилов и при добавлении в культуральную суспензию вакцинного штамма BCG (живой аттенуированный штамм *M. bovis*). Выбор индуктора производили с учетом данных литературы, отражающих способность эозинофильных лейкоцитов взаимодействовать с микобактериями различных видов с последующим высвобождением цитокинов [Legrand F. et al., 2009; Корецкая Н. М., 2011].

Известно, что значительную роль в патогенезе ТЛ играет IL-2 – ключевой ростовой фактор Т-лимфоцитов, направляющий дифференцировку лимфоцитов из Th0 в Th1 и регулирующий клеточно-опосредованные реакции иммунитета на *M. tuberculosis* [Воронкова О.В. и соавт., 2007; Сахно Л.В. и соавт., 2011; Симбирцев А.С., 2011].

В результате исследования *in vitro* у больных ТЛ были зарегистрированы разнонаправленные изменения базальной продукции эозинофилами IL-2: гипопродукция IL-2 при ИТЛ с эозинофилией и, напротив, гиперсекреция цитокина при ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией; у больных ТЛ без эозинофилии независимо от клинической формы и варианта устойчивости МБТ к ПТП уровень базальной продукции IL-2 соответствовал норме (табл. 4). Однозначная интерпретация изменений IL-2-секреторной функции эозинофилов при ТЛ представляется затруднительной. Снижение базальной секреции IL-2 *in vitro*, вероятно, может быть результатом токсического действия *M. tuberculosis* на эозинофильные гранулоциты, которые способны активно взаимодействовать с микобактериями различных видов. Гиперсекреция IL-2 эозинофилами крови при ДТЛ, характеризующимся более выраженным иммунологическим дисбалансом, по всей видимости, связана не только с реализацией данным медиатором функции лимфоцитарного фактора роста, но и активацией регуляторных Т-клеток (Treg), проявляющих иммуносупрессорные свойства [Malek T., Bayer A., 2004].

Еще одним медиатором, секретируемым эозинофилами и участвующим в регуляции механизмов антибактериальной резистентности макроорганизма, является TNF α . Локальное высвобождение данного цитокина приводит к усилению хемотаксиса лейкоцитов, активации поглотительной и переваривающей функций фагоцитирующих клеток, а также сдвигу цитокинового баланса в направлении Th1 [Herbein H, Brien W.A., 2000; Temkin V., Levi-Schaffer F., 2001].

В результате проведенного исследования *in vitro* установлено увеличение базальной секреции TNF α эозинофильными гранулоцитами только у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией (табл. 4). Полученные данные укладываются в представления об эозинофил-активирующих свойствах данного цитокина, способного продлевать время пребывания эозинофильных гранулоцитов в циркуляции путем стимуляции секреции GM-CSF [Temkin V., Levi-Schaffer F., 2001]. Установлена положительная корреляционная зависимость между содержанием эозинофилов в крови и базальной продукцией TNF α у больных ЛУ ИТЛ с эозинофилией ($r=0,67$, $p<0,05$). В условиях гиперсекреции TNF α может дополнительно активировать процессы адгезии, миграции и дегрануляции эозинофилов, усиливая тем самым эффекторный потенциал клеток. У больных ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, была выявлена отрицательная

корреляционная связь между концентрацией TNF α в интактной культуре клеток и активностью пероксидазы в эозинофилах ($r=-0,75$, $p<0,05$).

Таблица 4

Содержание цитокинов в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	IL-2		TNF α		IL-5		
	Интактная	BCG-индуцированная	Интактная	BCG-индуцированная	Интактная	BCG-индуцированная	
Здоровые доноры	52,29 (24,45-69,50)	57,35 (30,70-65,76)	615,25 (553,50-1014,20)	855,44 (622,90-1352,00) $p_4<0,05$	6,22 (3,13-10,75)	9,15 (4,51-12,61) $p_4<0,05$	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	ИТЛ	38,37 (22,30-49,02) $p_1<0,05$	44,35 (28,99-50,27) $p_1<0,05$	881,38 (659,84-1559,04) $p_1<0,05$	1665,83 (662,85-2295,01) $p_1<0,05$ $p_4<0,05$	15,61 (12,69-19,08) $p_1<0,05$	28,27 (22,03-36,08) $p_1<0,05$ $p_4<0,05$
	ДТЛ	76,63 (51,50-80,15) $p_1<0,05$ $p_3<0,05$	67,05 (60,10-71,50) $p_1<0,05$	964,02 (655,98-1533,93) $p_1<0,05$	1025,00 (817,32-2140,00) $p_1<0,05$ $p_3<0,05$	14,56 (11,67-20,34) $p_1<0,05$	27,58 (24,73-28,60) $p_1<0,05$ $p_4<0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	ИТЛ	57,15 (24,75-70,24) $p_2<0,05$	40,25 (23,06-62,04) $p_1<0,05$ $p_2<0,05$ $p_4<0,05$	645,70 (554,23-987,25) $p_2<0,05$	1381,40 (827,20-1640,10) $p_1<0,05$ $p_4<0,05$	4,16 (2,31-12,80) $p_1<0,05$ $p_2<0,05$	4,92 (1,61-7,45) $p_1<0,05$ $p_2<0,05$
	ДТЛ	50,65 (23,42-71,35) $p_2<0,05$	52,25 (39,74-59,74) $p_2<0,05$ $p_3<0,05$	641,90 (347,39-1028,00) $p_2<0,05$	833,55 (432,64-1794,20) $p_2<0,05$ $p_3<0,05$ $p_4<0,05$	4,99 (2,52-10,53) $p_2<0,05$	4,50 (2,13-9,45) $p_1<0,05$ $p_2<0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p_3 – у больных инфильтративным туберкулезом легких; p_4 – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Наряду с провоспалительными медиаторами эозинофильные гранулоциты секретируют цитокины, опосредующие гуморальные реакции иммунитета. Представителем цитокинов, направляющих дифференцировку лимфоцитов из Th0 в Th2, является IL-5, который стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки В-лимфоцитов посредством усиления экспрессии рецептора к IL-2 на В-клетках, а также индуцирует продукцию В-клетками цитокинов и (при

трансформации их в плазматические клетки) иммуноглобулинов различных классов [Woerly G. et. al., 1999; Lacy P., Moqbel R., 2000].

Как показали результаты проведенных нами исследований, спонтанная секреция IL-5 эозинофильными гранулоцитами периферической крови оказалась достоверно выше у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 4). В связи с этим, важно отметить, что гиперпродукция Th2-цитокинов клетками крови ассоциирована с прогрессирующим течением ТЛ с преобладанием деструктивных изменений в легочной ткани [Howard A.D., Zwilling B.S., 1999].

Исследование цитокинсекреторной активности эозинофильных гранулоцитов при добавлении в культуральную суспензию клеток вакцинного штамма BCG позволило констатировать достоверное повышение уровней BCG-индуцированной *in vitro* продукции IL-5 и TNF α у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией, уровень BCG-индуцированной секреции IL-2 увеличивался лишь у пациентов с диссеминированной формой ТЛ (табл. 4). Выявленные изменения свидетельствуют, на наш взгляд, о повышенной реактивности эозинофильных клеток, способных регулировать процессы адаптивного противотуберкулезного иммунитета при дополнительной антигенной нагрузке.

Таким образом, эозинофильные гранулоциты крови при ТЛ (особенно сопровождающимся эозинофилией) характеризуются высокой активностью в отношении экспрессии рецепторов, опосредующих длительное пребывание их в кровотоке с последующей миграцией в очаг воспаления. Это в сочетании с истощением пероксидазной активности клеток в условиях активации их фагоцитарной функции свидетельствует об участии эозинофилов в реализации эффекторных механизмов противотуберкулезной резистентности. Гиперсекреция эозинофилами медиаторов Th1- и Th2-профиля подтверждает их иммунорегуляторные свойства и способность вносить вклад в общий цитокиновый дисбаланс, формирующийся при туберкулезной инфекции.

Роль эозинофилии крови в развитии иммунопатологических изменений при туберкулезе легких

На сегодняшний день не существует единого мнения, касающегося влияния эозинофильных гранулоцитов (в условиях их избыточного содержания в крови) на состояние иммунитета, течение и исход ТЛ. Сложившиеся представления о прогностическом значении гемической эозинофилии при ТЛ носят весьма противоречивый характер. Одни исследователи утверждают, что эозинофилия крови в сочетании с лимфоцитозом является показателем адекватного противотуберкулезного иммунного ответа, определяющего благоприятное течение туберкулезной инфекции, а возникновение анэозинофилии является негативным прогностическим симптомом [Мишин В. Ю. и соавт., 2004]. Другие указывают на

то, что эозинофильная реакция крови, напротив, сопровождает деструктивные формы ЛУ ТЛ, характеризующегося более тяжелым течением [Полосухин В.В., 1997; Kirman J. et al., 2009].

В связи с этим, в настоящем исследовании проведена сравнительная оценка основных параметров иммунного ответа, проанализированы особенности клинической картины и рентгенологических проявлений ТЛ в зависимости от количества эозинофилов в периферической крови с учетом формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП.

Известно, что течение ТЛ сопровождается выраженной депрессией клеточного звена иммунитета со снижением общего числа лимфоцитов в периферической крови, дисбалансом отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов, угнетением их функциональной активности [Кноринг Б.Е. и соавт., 1998, 2001; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009].

Как показали результаты проведенного нами исследования, абсолютное содержание лимфоцитов в крови у больных ТЛ без эозинофилии и ДТЛ с эозинофилией значимо не отличалось от контрольных значений, а у больных ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно увеличивалось. При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных ДТЛ независимо от количества эозинофильных лейкоцитов в периферической крови было зарегистрировано статистически значимое снижение (по сравнению с контрольными значениями) относительного и абсолютного числа $CD3^+$ Т-лимфоцитов (соответственно до $(0,92 \pm 0,19) \times 10^9/\text{л}$ и $(40,93 \pm 3,84) \%$ у больных ДТЛ с эозинофилией и до $(0,82 \pm 0,11) \times 10^9/\text{л}$ и $(51,43 \pm 5,15) \%$ у больных ДТЛ без эозинофилии).

Одновременно с этим, у всех больных ТЛ было установлено статистически значимое повышение относительного числа $CD20^+$ лимфоцитов в крови. При этом абсолютное их содержание увеличивалось только у пациентов с ИТЛ ($(0,59 \pm 0,09) \times 10^9/\text{л}$) и ДТЛ ($(0,53 \pm 0,09) \times 10^9/\text{л}$), сопровождающимся эозинофилией, что свидетельствует о более выраженной активации гуморального звена иммунной системы в условиях развития эозинофильной реакции крови. У пациентов данных групп наблюдения эозинофильные гранулоциты крови секретировали повышенное количество IL-5 (табл. 4) – медиатора, способного усиливать пролиферацию и дифференцировку активированных В-лимфоцитов за счет индукции экспрессии рецептора к IL-2 на этих клетках, активации продукции В-клетками цитокинов и иммуноглобулинов. В свою очередь, известно, что иммуноглобулины различных классов обнаруживаются в периферической крови при любых формах ТЛ. Анализ суммарного пула специфических к антигенам микобактерий иммуноглобулинов класса G, M и A у больных ТЛ выявил присутствие противотуберкулезных

антител в сыворотке крови у 40 % пациентов с эозинофилией, что не имело статистически значимых различий с группой больных, в крови которых количество эозинофилов соответствовало контрольным значениям.

Приоритет в модуляции функций иммунокомпетентных клеток в реализации противотуберкулезного иммунитета, безусловно, принадлежит цитокинам.

Ключевым цитокином, обеспечивающим протективный иммунный ответ при туберкулезной инфекции, является IFN γ . Последний обладает широким спектром свойств, включая активацию микробицидных свойств макрофагов (посредством усиления продукции TNF α , IL-1, IL-6 и др.), усиление синтеза оксида азота и кислородных радикалов клетками, индукцию экспрессии антигенов МНС класса II на антигенпрезентирующих клетках (АПК) и др.

В результате проведенного исследования было зарегистрировано статистически значимое снижение концентрации IFN γ в крови у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией (5,85 (3,86-7,31) пг/мл у больных ИТЛ и 4,95 (3,86-6,21) пг/мл у больных ДТЛ). Дефицит IFN γ в сочетании с высоким числом эозинофилов в крови при ТЛ обусловлен, вероятно, преобладанием иммунорегуляторных цитокинов, опосредующих формирование гуморального иммунитета, подавляющих пролиферацию Th1-лимфоцитов и их способность секретировать основные противотуберкулезные медиаторы. Следует отметить, что недостаток IFN γ может выступать в качестве фактора, способствующего развитию эозинофилии в крови и тканях при ТЛ [Kirman J. et al. 2000]. В настоящем исследовании была установлена отрицательная корреляционная связь между содержанием IFN γ и количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической крови при ТЛ ($r=-0,87$, $p<0,05$).

Наряду с IFN γ в комплексе защитных реакций при туберкулезной инфекции важную роль играет IL-2. Основная функция данного медиатора заключается в активации пролиферации лимфоцитов, стимулированных антигеном. Действуя через специфические рецепторы на клетках, IL-2 инициирует реализацию функций Т-лимфоцитов-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, направляя иммунный ответ по Th1-зависимому пути [Галактионов В.Г., 1998; Кашкин К.П., 1998; Симбирцев А.С., 2004; Суркова Л.К. и соавт., 2007; Симбирцев А.С., 2011].

При исследовании *in vitro* продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами при ТЛ нами было установлено снижение базальной продукции медиатора только у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, в то время как угнетение BCG-индуцированной секреции IL-2 отмечалось у всех пациентов. Наиболее выраженное снижение продукции IL-2 было зарегистрировано при ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 5).

Таблица 5

Содержание цитокинов в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких
(пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Обследованные лица		IL-2		IL-4		IL-10		TGFβ	
		Интактная	BCG-индуцированная	Интактная	BCG-индуцированная	Интактная	BCG-индуцированная	Интактная	BCG-индуцированная
Здоровые доноры		22,26 (10,82-30,18)	69,36 (13,94-165,80) p ₄ <0,05	39,98 (21,14-55,04)	43,69 (26,46-68,55) p ₄ <0,05	25,29 (13,50-33,56)	26,21 (22,74-60,22)	1108,75 (929,80-1487,20)	1087,80 (500,00-1412,60)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	ИТЛ	14,26 (10,34-20,78) p ₁ <0,05	32,26 (24,45-61,04) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05	60,23 (35,56-81,34) p ₁ <0,05	62,64 (41,94-80,45) p ₁ <0,05	21,79 (13,37-30,02)	42,06 (31,12-64,00) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05	1318,80 (640,23-1403,07) p ₁ <0,05	683,90 (542,50-743,86) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05
	ДТЛ	10,59 (6,74-14,26) p ₁ <0,05	33,85 (15,60-52,10) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05	58,64 (23,54-64,30) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	61,36 (39,11-79,32) p ₁ <0,05	19,34 (16,40-25,27)	48,28 (23,71-72,25) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05	1434,39 (764,93-2159,11) p ₁ <0,05	1293,67 (714,45-1793,00) p ₃ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	ИТЛ	20,11 (16,52-26,73) p ₂ <0,05	14,29 (9,36-23,52) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	35,45 (16,26-52,27) p ₂ <0,05	26,53 (19,53-52,67) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	52,29 (27,73-61,06) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	59,27 (42,63-65,18) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	812,83 (471,52-1079,10) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	955,30 (317,46-1147,26) p ₂ <0,05
	ДТЛ	23,67 (20,99-44,34) p ₂ <0,05	26,10 (18,74-34,39) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	54,82 (39,71-78,20) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	59,72 (44,12-89,88) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	19,20 (11,43-32,17) p ₃ <0,05	26,63 (21,57-44,23) p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	1227,72 (751,30-1676,20) p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	712,70 (642,50-789,56) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05

Примечание: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p₂ – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p₃ – у больных инфильтративным туберкулезом легких; p₄ – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных, ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких, ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких.

Выявленная нами гипопродукция IL-2 мононуклеарами крови при ТЛ, с одной стороны, может быть результатом токсического влияния *M. tuberculosis* на процессы синтеза и высвобождения цитокина иммунокомпетентными клетками, а с другой, - проявлением функциональной анергии Т-клеток, ассоциированной с тяжестью заболевания [Сахно Л.В. и соавт., 2004; Черных Е.Р. и соавт., 2002]. По результатам исследования, регистрировалось менее выраженное снижение VSG-индуцированной секреции IL-2 *in vitro* при лекарственно-резистентном ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией и ИТЛ без эозинофилии, чем при лекарственно-чувствительном варианте заболевания.

Многогранность функционального потенциала IL-2 в формировании адаптивного противотуберкулезного иммунитета проявляется в том, что он выполняет не только функции ростового фактора, но и осуществляет контроль за гиперактивацией иммунной системы посредством стимуляции дифференцировки Treg-лимфоцитов [Malek T., Bayer A., 2004]. На сегодняшний день хорошо изучены две разновидности Treg – естественные тимические (Tnr) и индуцированные на периферии (Tir) [Lee D.C. et al., 2010; Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. Показано, что Treg несут различные поверхностные (CD25, CTLA-4) и внутриклеточные (транскрипционный фактор Foxp3) молекулы, благодаря которым осуществляется их иммуносупрессорный эффект. Важным механизмом супрессии Treg является лизис иммунокомпетентных клеток за счет продукции гранзимов А и В, а также подавление функциональной активности эффекторных Т-клеток путем секреции угнетающих иммунный ответ цитокинов (IL-10 и TGFβ) [Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011].

По мнению исследователей, избыточная активность Treg обуславливает снижение интенсивности протективного иммунного ответа в борьбе макроорганизма с *M. tuberculosis* [Lee D.C. et al., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2012].

Учитывая изложенное выше, в настоящем исследовании была предпринята попытка оценить содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих молекулу Foxp3, у больных ТЛ в зависимости от числа эозинофилов в периферической крови. При этом было выявлено достоверное повышение количества CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg у всех пациентов с ТЛ, тогда как содержание CD25-негативных Treg-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточный маркер Foxp3, возрастало только у больных ЛУ ДТЛ без эозинофилии. Обращало на себя внимание достоверное увеличение численности Т-лимфоцитов с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (6,28 (4,02-9,00) % у больных ИТЛ и 6,72 (3,92-11,56) % у больных ДТЛ), при этом более выраженные изменения количества Treg были обнаружены при лекарственно-устойчивом варианте заболевания (7,04 (6,78-11,48) %, p₄<0,05).

Следует отметить, что у больных ТЛ с эозинофилией увеличение содержания Foxp3^+ Treg-лимфоцитов в крови происходило на фоне гипосекреции мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* IL-2 – ключевого фактора, опосредующего процесс пролиферации регуляторных клеток [Thornton A.M., 2006]. В то же время, у больных ДТЛ в сочетании с эозинофилией был зарегистрирован высокий уровень продукции IL-2 в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов *in vitro*. Гиперсекреция IL-2 эозинофильными гранулоцитами в условиях повышенного их содержания в крови, по-видимому, может обуславливать конверсию Т-хелперов в $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Treg-лимфоциты при ТЛ (рис. 5).

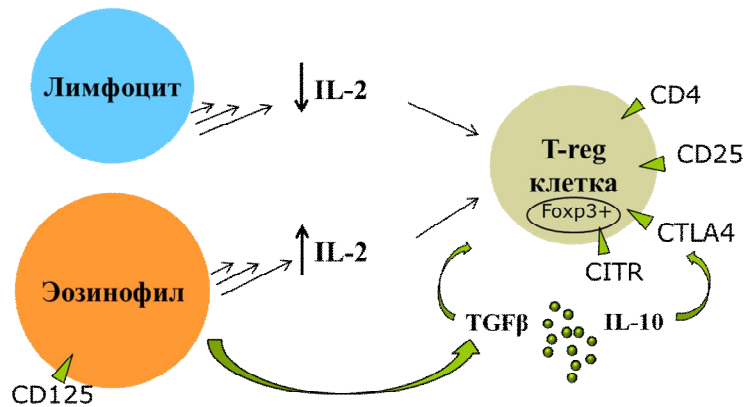


Рис. 5. Секреция цитокинов эозинофильными гранулоцитами и регуляторными Т-клетками при туберкулезе легких

Способность эозинофильных гранулоцитов опосредовать накопление Treg в крови при ТЛ подтверждается наличием положительной корреляционной зависимости между базальной секрецией IL-2 в культуре эозинофилов *in vitro* и содержанием $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ Treg при ЛУ ДТЛ ($r=0,79$, $p<0,05$).

Показано, что реализация супрессорного потенциала Treg может происходить при непосредственном контакте между клетками (конкурентное CTLA4/B7 взаимодействие) или за счет секреции цитокинов-ингибиторов иммунного ответа (IL-10 и TGFβ) [Takahashi T. et al., 1998; Sakaguchi S. 2004; Nishikawa H., Sakaguchi S., 2005; Чурина Е.Г., 2012].

В ходе настоящего исследования в условиях *in vitro* было зарегистрировано увеличение уровня спонтанной и VCG-индуцированной секреции IL-10 мононуклеарными лейкоцитами при ЛЧ ИТЛ без эозинофилии (табл. 5). Установлена отрицательная корреляция между повышенной концентрацией IL-10 в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов и содержанием IL-5 в крови у пациентов данной группы ($r=-0,67$, $p<0,05$), что подтверждает супрессорные свойства цитокина, способного подавлять продукцию IL-5 Th2-лимфоцитами. У больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, независимо от формы заболевания и лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП на фоне

высокого уровня IL-5 в крови базальная секреция IL-10 соответствовала контрольным значениям, а уровень BCG-индуцированной секреции этого медиатора достоверно превышал таковой у здоровых лиц (табл. 5).

Следует отметить, что при ТЛ с эозинофилией нормальный уровень секреции IL-10 *in vitro* сочетался с высоким числом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т-лимфоцитов и низкой концентрацией IFN γ в крови и IL-2 в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro*. Учитывая, что IL-10 – это не единственный антагонист цитокинов клеточного звена иммунитета (IFN γ , IL-12 и IL-2) и активатор супрессорных механизмов, установленное нами противоречие можно объяснить включением в регуляцию Th1/Th2-баланса при туберкулезной инфекции с эозинофилией других цитокинов, в частности TGF β , главным свойством которого является супрессия всех типов иммунного ответа [Ярилин А.А., 2010; Симбирцев А.С., 2011].

Согласно результатам, полученным в настоящем исследовании, уровень базальной продукции TGF β в культуре мононуклеарных лейкоцитов у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно превышал контрольные значения и параметры спонтанной секреции медиатора при ТЛ без эозинофилии (табл. 5). Максимальный уровень базальной и индуцированной *in vitro* продукции TGF β регистрировался при ЛУ ДТЛ с эозинофилией (1632,12 (774,90-2005,78) пг/мл, $p_4 < 0,05$). Профицит секреции TGF β у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, по всей видимости, является проявлением гиперфункции основных клеток-продуцентов этого цитокина. Учитывая, что TGF β является цитокином, опосредующим пролиферацию, дифференцировку Treg и одновременно реализацию ими иммуносупрессорных свойств, избыточные концентрации медиатора при ТЛ могут, с одной стороны, быть причиной увеличения численности субпопуляции Treg, а с другой, - следствием избыточного содержания последних в крови. Накопление Treg-лимфоцитов в сочетании с высоким уровнем TGF β может быть механизмом иммуносупрессии при ТЛ (в частности при ДТЛ), течение которого сопряжено с эозинофильной реакцией крови. Вместе с тем, эозинофильные гранулоциты сами являются источником TGF β , особенно при заболеваниях, сопровождающихся эозинофилией [Lacy P., Moqbel R., 1997; Melo R.C. et al., 2005, 2008; Spencer L.A. et al., 2009].

Еще одним антагонистом Th1-цитокинов является IL-4 – ключевой цитокин Th2-зависимого иммунного ответа, который стимулирует пролиферацию В-лимфоцитов и их дифференцировку в плазматические клетки, усиливает экспрессию генов иммуноглобулинов и тем самым обеспечивает наработку антител при воспалении. Кроме этого, IL-4 наряду с IL-2 участвует в регуляции баланса механизмов активации и супрессии иммунного ответа [McCoy M.E. et al.,

2010].

Как показали результаты проведенного нами исследования, уровень базальной секреции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* достоверно превышал показатель нормы у всех больных ТЛ с эозинофилией независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП (табл. 5), в то время как у больных без эозинофилии повышение базальной секреции цитокина регистрировалось только при ЛУ ДТЛ. У больных ТЛ в сочетании с эозинофилией была установлена положительная корреляция между базальной гиперсекрецией IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* и концентрацией IL-5 (медиатора гуморального иммунного ответа) в крови ($r=0,88$, $p<0,05$ и $r=0,74$, $p<0,05$ при ИТЛ и ДТЛ соответственно). У пациентов данных групп наблюдения было зарегистрировано достоверное увеличение абсолютного числа CD20⁺ В-лимфоцитов, что, с одной стороны, может быть причиной, а с другой, - следствием повышенной наработки медиаторов гуморального звена иммунной системы в условиях эозинофилии крови.

Таким образом, ТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови характеризуется снижением концентрации ключевых цитокинов противотуберкулезного иммунитета на фоне увеличения продукции медиаторов с иммуносупрессорной активностью в сочетании с повышением содержания В-лимфоцитов и Treg в крови. Выявленные изменения указывают на превалирование специфического иммунного Th2-ответа, выполняющего скорее вспомогательную роль в механизмах защиты макроорганизма от МБТ. Преобладание гуморального звена иммунного ответа в сочетании с активацией клеток-супрессоров при ТЛ является неблагоприятным фактором, определяющим более тяжелое прогрессирующее течение заболевания [Комогорова Е.Э. и соавт., 2005; Пичугин А.В., 2005; Левашов Ю.Н., Репин Ю.М., 2008; Сахно Л.В. и соавт., 2011].

Клиническое течение туберкулезной инфекции определяется многими факторами и зависит от площади повреждения ткани легких, патогенности МБТ, а также от состояния общей иммунологической реактивности макроорганизма.

В результате проведенного нами исследования установлено, что у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой острый характер начала заболевания с проявлениями интоксикационного синдрома (повышение температуры тела, ночные поты, слабость, повышенная утомляемость, снижение или отсутствие аппетита, потеря массы тела) сочетался с симптомами воспалительных изменений в легочной ткани (кашель, выделение мокроты, кровохарканье, одышка), что отражает значительный характер распространенности процесса в легких.

Сравнительный анализ рентгенологических проявлений туберкулезной инфекции в зависимости от числа эозинофилов в периферической крови с учетом

вариантов клинических форм заболевания позволил установить, что при ДТЛ с эозинофилией очаги деструкции регистрировалась у $100,00 \pm 0,00$ % больных; у пациентов с ТЛ без эозинофилии деструктивные изменения легочной ткани обнаруживались лишь в $60,35 \pm 7,37$ % случаев ($p < 0,001$) (табл. 6).

По результатам сравнительного анализа деструктивных поражений легочной ткани была установлена достоверная взаимосвязь между наличием деструкции в легких и эозинофилией в периферической крови ($r_a = 0,50$, $p < 0,05$ при ИТЛ и $r_a = 0,71$, $p < 0,05$ при ДТЛ).

Таблица 6

Рентгенологические проявления у больных туберкулезом легких (%)

Рентгенологические проявления патологического процесса в легких		Больные инфильтративным туберкулезом легких		Больные диссеминированным туберкулезом легких	
		С эозинофилией (n=62)	Без эозинофилии (n=70)	С эозинофилией (n=40)	Без эозинофилии (n=45)
Площадь поражения	от 2 до 4 сегментов	8,06±3,48	10,00±6,67	7,00±2,64	12,50±4,67
	более 4 сегментов в пределах одного легкого	75,71±4,76	69,43±4,50	25,33±6,96	40,16±4,62
	оба легких	16,23±4,72	20,57±4,24	67,51±6,43	47,34±4,24 $p < 0,05$
Характер образований	очаги	59,86±4,20	66,35±5,67	67,74±7,48	62,50±7,75
	инфильтраты	40,14±6,27	33,65 ±5,68	32,26±3,27	37,50±4,63
Деструктивные изменения в легочной ткани		70,00±5,89	61,50±5,84	100,00±0,00	60,35±7,37 $p < 0,001$
Темпы рассасывания очагово-инфильтративных образований в легких	быстрый (до 3 мес.)	10,00±3,85	50,07±6,02 $p < 0,001$	0,00±0,00	25,00±6,52 $p < 0,001$
	средний (3-6 мес.)	59,76±6,28	31,63 ±5,58 $p < 0,001$	0,00±0,00	12,50 ±5,58 $p < 0,001$
	медленный (6 и более мес.)	30,24±3,12	18,30±4,65	100,00±0,00	62,5±7,30 $p < 0,001$
Остаточные изменения в ткани легких (очаги фиброза)		60,00±6,27	77,10 ±4,86	48,43±7,56	50,06 ±7,53

Примечание: p - уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у больных туберкулезом легких с эозинофилией.

Способность эозинофильных гранулоцитов инициировать повреждение легочной ткани при аккумуляции в очаге гранулематозного воспаления [Lasco T.M. et al., 2004; Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009; Hattori Y. et al., 2011] может быть обусловлена широким спектром агрессивных цитотоксических факторов, содержащихся в гранулах этих клеток. Следствием дегрануляции эозинофилов в тканях макроорганизма при эозинофил-ассоциированных

заболеваниях является деструкция эпителия воздухоносных путей, эпителия желудочно-кишечного тракта, эндотелия, тканей эндокарда, легких и др. [Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Lucendo A.J. et al., 2007; Miyoshi R. et al., 2007; Baandrup U., 2012].

Факт деструкции тканей при гиперэозинофилиях некоторые исследователи ассоциируют с высоким уровнем TNF α , цитотоксическая активность которого опосредована активацией ЕРО [Бережная Н.М., 2000]. Последний тезис позволяет интерпретировать возможные механизмы деструктивных изменений в легочной ткани при ТЛ. У больных ТЛ с эозинофилией установлена гиперсекреция TNF α *in vitro* на фоне снижения активности пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах. Обнаружена отрицательная корреляция между концентрацией TNF α в интактной культуре клеток и активностью пероксидазы в эозинофилах ($r=-0,75$, $p<0,05$ при ДТЛ). Подтверждением деструктивного потенциала TNF α при туберкулезной инфекции является выявленная нами достоверная взаимосвязь между базальным уровнем медиатора и наличием деструкции в легких при ТЛ ($r_a=0,59$, $p<0,05$).

Известно, что преобладание альтеративных изменений в тканях сопряжено с замедлением репаративных явлений и положительной динамики развития инфекционного процесса. Анализ сроков рассасывания очагово-инфильтративных поражений в легочной ткани у больных ТЛ в зависимости от числа эозинофилов в крови показал, что при ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, преобладали средние его темпы, а при ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, в 100,00 \pm 0,00 % случаев регистрировались медленные темпы восстановления легочной ткани (табл. 6). В результате проведенного нами корреляционного анализа была установлена достоверная взаимосвязь между средними и медленными темпами рассасывания очагово-инфильтративных образований и эозинофилией крови ($r_a=0,66$, $p<0,05$ при ИТЛ и $r_a=0,87$, $p<0,01$ при ДТЛ).

Рассасывание инфильтратов с трансформацией грануляций в соединительную ткань может привести к развитию фиброзных изменений (остаточных посттуберкулезных изменений) в ткани легких. Локальные фиброзные изменения с отсутствием специфической грануляционной ткани в очагах являются критерием благополучного завершения туберкулезного воспаления и подтверждением клинического излечения пациента [Перельман М.И., 2001; Блум Б.Р., 2002; Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007]. В фиброзировании гранулематозных очагов участвуют фибробласты, активирующим фактором которых является TGF β , способный стимулировать метаболизм соединительной ткани и восстановление исходной структуры органа [Ярилин А.А. и соавт., 2010].

В ходе проведенного нами исследования при ТЛ установлено увеличение числа эозинофильных гранулоцитов в крови и секреции TGF β *in vitro*. Это

указывает на возможность развития более выраженных фиброзных изменений при ТЛ, течение которого сопряжено с эозинофилией крови. Однако у больных ТЛ достоверной взаимосвязи между наличием фиброза и эозинофилией крови выявлено не было.

Учитывая способность эозинофильных гранулоцитов участвовать в патогенезе туберкулезной инфекции, нами была проанализирована связь эозинофильной реакции крови со сроками негативации мокроты у больных ТЛ. Согласно рекомендациям специалистов ВОЗ, конверсия мокроты – прекращение выделения МБТ с мокротой (абациллирование), регистрируемое по результатам микроскопического исследования мазка мокроты и результатам посева мокроты на питательные среды, является промежуточным индикатором и критерием эффективности лечения больных ТЛ [Holtz T.H. et al., 2006; Kawai V. et al., 2006; Филинюк О.В., 2011].

При проведении сравнительного анализа сроков негативации мокроты в зависимости от числа эозинофильных гранулоцитов в крови при ТЛ достоверных отличий зарегистрировано не было. У больных ТЛ с эозинофилией сроки абациллирования соответствовали $(2,20 \pm 1,50)$ мес., у пациентов с ТЛ без эозинофилии – $(3,10 \pm 2,01)$ мес.

При сопоставлении сроков негативации мокроты с количеством эозинофильных гранулоцитов в крови было показано, что при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, на момент абациллирования абсолютное и относительное количество эозинофилов оказалось равным $(0,476 \pm 0,099) \times 10^9/\text{л}$ и $5,63 \pm 2,03$ % соответственно. При этом высокое содержание эозинофилов в крови на момент абациллирования регистрировалось лишь у $37,58 \pm 6,11$ % больных ТЛ с гемической эозинофилией. У $62,42 \pm 4,53$ % пациентов с ТЛ, в крови которых содержание эозинофилов до лечения было повышенным, в период негативации мокроты отмечалось снижение содержания этих клеток до нормального уровня $((0,264 \pm 0,102) \times 10^9/\text{л}$ и $3,10 \pm 1,93$ %).

Таким образом, ТЛ, сопровождающийся эозинофилией крови, характеризуется преобладанием отрицательной динамики клинико-рентгенологических признаков распространенного деструктивного процесса в легочной ткани. Это в сочетании с участием эозинофилов в реализации механизмов иммуносупрессии и деструкции легочной ткани, а также выявленного по итогам настоящего исследования дисбаланса иммунного ответа по пути доминирования Th2-реакций и факторов иммуносупрессии обосновывает негативную роль эозинофильной реакции крови в иммунопатогенезе ТЛ.

Генетически детерминированная дисрегуляция иммунного ответа

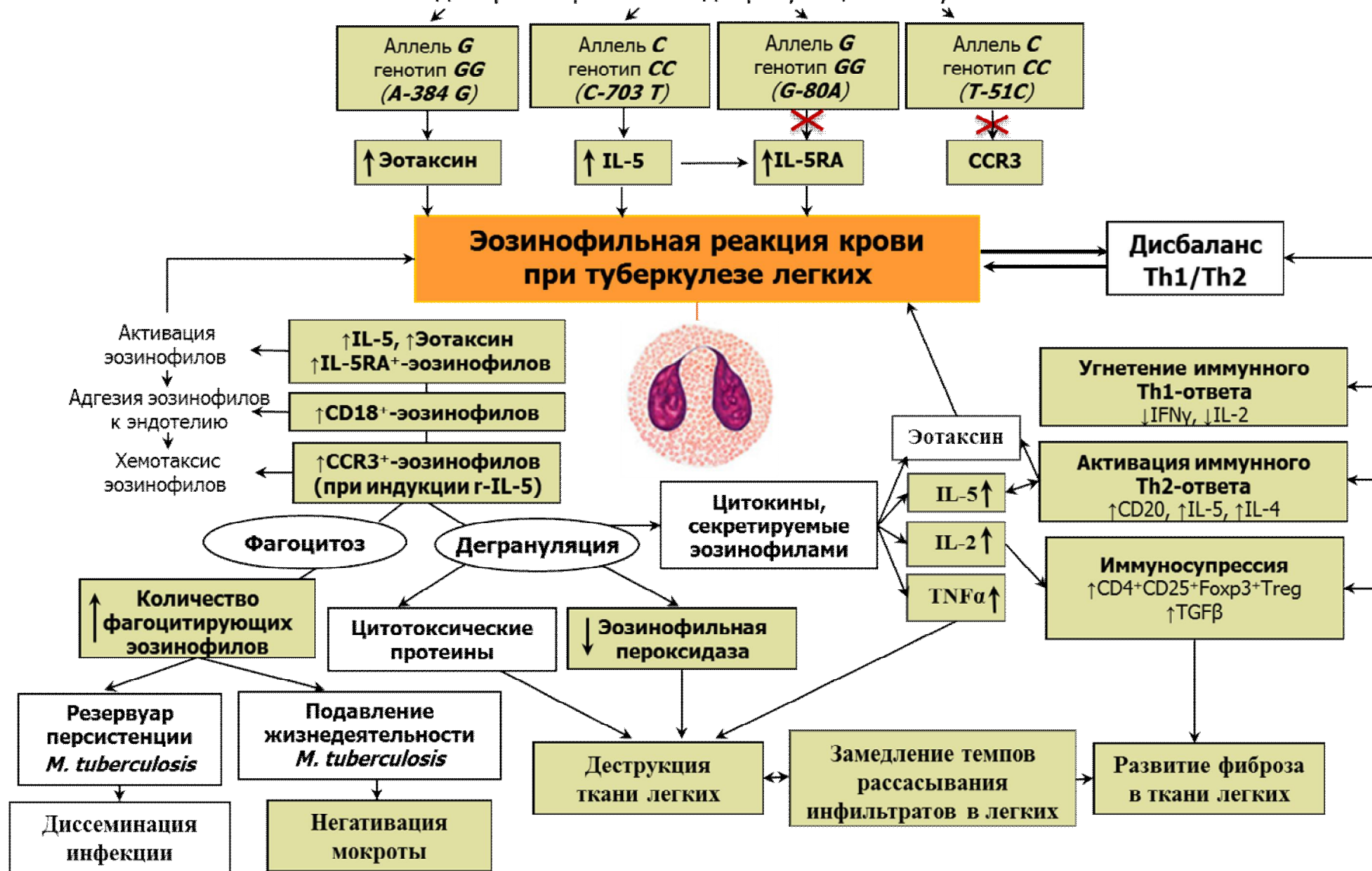


Рис. 8. Феномен эозинофилии при туберкулезе легких (по данным М.Е. Rothenberg, S.P. Hogan, 2006; S.P. Hogan et al., 2008; J. Kirman et al., 2009; N.S. Linch et al., 2009; Y. Hattori et al., 2011; V. Driss et al., 2012 и результатам собственных исследований (выделено бежевым цветом))

Выводы

1. Эозинофильная реакция крови при инфильтративном и диссеминированном лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких до проведения противотуберкулезной химиотерапии опосредована увеличением содержания CCL11/эотаксина, IL-5 и количества IL-5RA-позитивных эозинофилов в крови.
2. Развитие эозинофилии крови при туберкулезе легких ассоциировано с носительством генотипов CC полиморфного участка C-703T гена IL5 и GG полиморфизма A-384G гена CCL11, детерминирующих высокий уровень IL-5 и CCL11/эотаксина в крови. Гиперэкспрессия рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксину (CCR3) на эозинофилах крови не связана с полиморфными сайтами G-80A гена IL5RA и CC (T-51C) гена CCR3.
3. Туберкулез легких с эозинофилией характеризуется повышением секреции эозинофилами IL-5, TNF α и IL-2 (при диссеминированной форме) *in vitro*, а также более высокой, чем в отсутствие эозинофилии, фагоцитарной активностью клеток (в условиях менее значимого снижения активности внутриклеточной пероксидазы) при повышении числа эозинофилов, экспрессирующих IL-5RA и молекулы адгезии CD18. При этом количество CD9⁺ и CCR3⁺ эозинофилов сохраняется в пределах нормы.
4. Повышенное содержание IL-5 и IL-5RA⁺ эозинофилов в крови у больных туберкулезом легких с эозинофилией при отсутствии сочетанного увеличения концентрации CCL11/эотаксина и CCR3⁺ клеток свидетельствует о ведущей роли IL-5 в развитии эозинофилии при туберкулезной инфекции.
5. Эозинофильные гранулоциты при туберкулезе легких с эозинофилией независимо от клинической формы заболевания и устойчивости возбудителя к противотуберкулезным препаратам проявляют повышенную реактивность (гиперэргию) в условиях индукции *in vitro*, выражающуюся в увеличении секреции клетками IL-5 и TNF α (при действии BCG) и экспрессии IL-5RA и CCR3 (при действии рекомбинантного IL-5).
6. У больных туберкулезом легких с эозинофилией увеличение содержания иммуносупрессорных CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоцитов в периферической крови (более выраженное, нежели в отсутствие эозинофильной реакции крови) ассоциировано со снижением базальной и BCG-индуцированной секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* и (при диссеминированном туберкулезе легких) повышением его базальной *in vitro* секреции эозинофильными гранулоцитами.
7. Высокое содержание Treg-лимфоцитов в крови при туберкулезе легких с эозинофилией вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя

заболевания сопряжено с гиперсекрецией *in vitro* цитокинов с супрессорной активностью – IL-10 (при индукции BCG у больных инфильтративным и диссеминированным вариантами) и TGF β (базальной и при индукции BCG).

8. Активация иммуносупрессорных Treg-лимфоцитов и гиперсекреция IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* у больных туберкулезом легких с эозинофилией в сочетании с повышением содержания в их крови CD20⁺ В-лимфоцитов и IL-5 на фоне дефицита IFN γ подтверждают иммуномодулирующий эффект эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции, проявляющийся иммунным отклонением в направлении Th2-ответа.

9. Эозинофильная реакция крови при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких ассоциирована с деструктивными изменениями и замедлением темпов рассасывания инфильтратов в легочной ткани, но не оказывает значимого влияния на сроки негативации мокроты.

10. Признаки иммунного Th1/Th2-дисбаланса в условиях супрессии Th1-ответа и отрицательная динамика клинико-рентгенологических проявлений патологического процесса у больных туберкулезом легких с высоким содержанием эозинофилов в крови свидетельствуют о негативной роли эозинофилии в патогенезе туберкулезной инфекции.

СПИСОК РАБОТ,

ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинико-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, Р.Р. Хасанова, И.О. Наследникова, О.В. Филинюк, В.А. Серебрякова, **Ю.В. Колобовникова**, Е.Л. Никулина, Н.П. Пирогова, И.В. Березко // **Бюллетень сибирской медицины** (0,750). - 2010. - №3. - С. 42-50.

2. Реактивность иммунокомпетентных клеток при туберкулезе легких: молекулярно-генетическое исследование / О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, Р.Р. Хасанова, И.О. Наследникова, Е.Л. Никулина, Е.Г. Чурина, **Ю.В. Колобовникова**, В.В. Серебрякова // **Вестник Уральской академической науки** (0,444). - 2010. - Т. 32, №4. - С. 104-107.

3. Иммуногенетические маркеры социально значимых инфекций / В.А. Серебрякова, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, А.С. Чернов, Н.В. Шперлинг, В.В. Новицкий, Е.Л. Никулина, Н.А. Сухаленцева, К.О. Михеева, О.В. Воронкова, **Ю.В. Колобовникова**, Т.В. Федорович, Е.Н. Чернова // Материалы докладов всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы

функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии». - Новосибирск, 2010. – **Цитокины и воспаление**. - 2010. - Т. 9, №3. - С. 70-71.

4. Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / Е.Г. Чурина, О.В. Воронкова, О.И. Уразова, И.О. Наследникова, В.В. Новицкий, **Ю.В. Колобовникова**, В.В. Серебрякова, О.В. Филинук // Материалы докладов всероссийской научной конференции «Молекулярно-генетические основы функционирования цитокиновой сети в норме и при патологии». - Новосибирск, 2010. – **Цитокины и воспаление**. - 2010. - Т. 9, №3. - С. 74.

5. Роль IL-5 в формировании эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, К.О. Михеева // Материалы IX российско-германской научно-практической конференции им. Р. Коха и И.И. Мечникова «Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении». - Новосибирск, 2010. - С. 226-228.

6. Функциональный полиморфизм гена IL-2 при туберкулезе легких / И.О. Наследникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Е.Л. Никулина, Н.А. Сухаленцева, **Ю.В. Колобовникова**, О.В. Воронкова, В.А. Серебрякова, Е.Г. Чурина // Материалы IX российско-германской научно-практической конференции им. Р. Коха и И.И. Мечникова «Новые горизонты: инновации и сотрудничество в медицине и здравоохранении». - Новосибирск, 2010. - С. 234-236.

7. Цитокин-продуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких / А.Е. Колосова, О.И. Уразова, Е.Г. Чурина, О.В. Воронкова, **Ю.В. Колобовникова** // Материалы XI конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». - Томск, 2010. - С. 57-58.

8. Эозинофил и его роль в патологии / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, И.О. Наследникова, О.В. Воронкова, К.О. Михеева // **Иммунопатология, аллергология, инфектология** (0,857). - 2011. - №2. - С.12-17.

9. Роль интерлейкина-5 и эотаксина в формировании эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, К.О. Михеева, М.В. Игнатов // **Медицинская иммунология** (0,750). - 2011. - Т. 13, №2-3. - С. 273-278.

10. Цитокиноопосредованные механизмы формирования эозинофильной реакции крови при инфекционной патологии / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, Л.С. Литвинова, К.О. Михеева, М.В. Игнатов // Материалы всероссийской научной конференции молодых ученых

с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии - 2011». - Санкт-Петербург, 2011. - С. 89.

11. Особенности продукции TNF- α эозинофилами крови *in vitro* при туберкулезе легких / К.О. Михеева, **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, М.В. Игнатов, М.Д. Гончаров // Материалы XVII межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2011». - Санкт-Петербург, 2011. - С. 110-112.

12. Роль эотаксина в формировании эозинофилии крови при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, К.О. Михеева // Материалы IX съезда фтизиатров России. – **Туберкулез и болезни легких** (0,250). - 2011. - №4. - С. 199.

13. Цитокинопосредованные механизмы эозинофилии при туберкулезе легких / К.О. Михеева, **Ю.В. Колобовникова**, М.В. Игнатов, М.Д. Гончаров // Материалы XII Российского конгресса молодых ученых с международным участием «Науки о человеке». - Томск, 2011. - С. 67-68.

14. Субпопуляционный состав регуляторных Т-клеток крови у больных туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью / Е.Г. Чурина, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, **Ю.В. Колобовникова** // **Бюллетень сибирской медицины** (0,800). - 2011. - № 4. - С. 183-186.

15. Показатели клеточного и гуморального иммунного ответа при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, К.О. Михеева, М.В. Игнатов, О.В. Филинчук, О.И. Новосельцева, Е.П. Степанова // **Бюллетень сибирской медицины** (0,778). - 2012. - №1. - С. 39-45.

16. Эозинофил: современный взгляд на кинетику, структуру и функцию / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, С.П. Чумакова // **Гематология и трансфузиология** (1,400). - 2012. - №1. - С. 30-36.

17. Цитокинсекретирующая активность эозинофилов крови при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Воронкова, И.О. Наследникова, К.О. Михеева, М.В. Игнатов // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины** (0,571). - 2012. - Т. 153, №3. - С. 296-299.

18. Изменение бактерицидных свойств эозинофильных гранулоцитов при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий // Материалы I Международной интернет-конференции: «Медицина в XXI веке: традиции и перспективы». - Казань, 2012. - С. 115-117.

19. Молекулярные механизмы формирования эозинофилии крови при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, К.О. Михеева, М.Д. Гончаров // **Вестник РАМН** (1,0). - 2012. - №5. - С. 58-62.
20. Роль полиморфизма генов *IL5* (-703) и *IL5RA* (-80) в формировании эозинофилии крови при туберкулезе легких / К.О. Михеева, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, **Ю.В. Колобовникова**, М.Д. Гончаров, И.О. Наследникова // **Бюллетень сибирской медицины** (1,167). - 2012. - №4. - С. 57-63.
21. Роль полиморфизма генов *эотаксина* (-384) и *CCR3* (-51) в формировании эозинофилии крови при туберкулезе легких / К.О. Михеева, **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Филинюк, М.Д. Гончаров, И.О. Наследникова // **Бюллетень сибирской медицины** (0,429). - 2012. - №6. - С. 213-215.
22. Изменение эффекторных свойств эозинофильных гранулоцитов при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, С.П. Чумакова, В.В. Новицкий // **Фундаментальные исследования** (1,25). - 2012. - №8, Часть 2. - С. 339-343.
23. Клинико-рентгенологические особенности туберкулеза легких, сопровождающегося эозинофилией крови / **Ю.В. Колобовникова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.В. Филинюк, Е.В. Некрасов, М.Д. Гончаров // **Бюллетень сибирской медицины** (0,666). - 2012. - №6. - С. 207-210.
24. Роль регуляторных Т-клеток и эозинофилов в механизмах модуляции иммунного ответа при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, Е.Г. Чурина, О.И. Уразова, **Ю.В. Колобовникова**, Т.Е. Кононова, О.В. Воронкова // **Иммунология** (0,830). - 2012. - №4. - С. 184-188.
25. Факторы аккумуляции и миграции эозинофильных гранулоцитов при туберкулезе легких / **Ю.В. Колобовникова** // **Фундаментальные исследования** (5,0). - 2013. - №3, Часть 2. - С. 307-311.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких
 ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких
 ЛУ – лекарственная устойчивость
 ЛЧ – лекарственная чувствительность
 МБТ – микобактерии туберкулеза
 ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
 ПТП – противотуберкулезные препараты
 ТЛ – туберкулез легких

BCG (Bacillus Calmette-Guerin) – бацилла Кальметта-Герена
CCL (chemokine ligand) – хемокиновый лиганд, содержащий два остатка цистеина подряд
CCR (C-C chemokine receptor type) – хемокиновый рецептор
CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены
CR (complement receptor) – рецептор к компонентам комплемента
EPO (eosinophil peroxidase) – эозинофильная пероксидаза
IFN (interferon) – интерферон
IL (interleukin) – интерлейкин
Mac-1 (macrophage-1 antigen) - мембранный белок, гетеродимерный интегрин подсемейства β_2 -интегринов
MCP (macrophage chemotactic protein) – протеин-хемоаттрактант для моноцитов
LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) - мембранный белок, гетеродимерный интегрин подсемейства β_2 -интегринов
PAF (platelet activated factor) – фактор активации тромбоцитов
RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) – регуляция активации, экспрессии и секреции нормальных Т-клеток
TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста
TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли
Th (T-helpers) – Т-лимфоциты-хелперы
Treg (regulatory T-cells) – регуляторные Т-клетки
VCAM (vascular cell adhesion molecule) – молекулы адгезии сосудистого эндотелия
VLA (very late antigen) – антигены на поверхности клеток на поздней стадии клеточной активации