

На правах рукописи

МИХЕЕВА КСЕНИЯ ОЛЕГОВНА

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ
ЭОЗИНОФИЛИИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2013

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

Научные руководители:

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,
профессор кафедры морфологии и
общей патологии ГБОУ ВПО
СибГМУ Минздрава России

Хлусов
Игорь Альбертович

доктор медицинских наук, заведующий
лабораторией нейробиологии ФГБУ
«НИИПЗ» СО РАМН

Солонский
Анатолий Владимирович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», г. Новосибирск.

Защита состоится: «___» _____ 2013 г. 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. Согласно современным представлениям, туберкулез легких (ТЛ) может сопровождаться эозинофильной реакцией крови. Большинство исследователей связывают возникновение эозинофилии с прямым действием противотуберкулезных препаратов, однако эозинофильная реакция крови нередко возникает у больных ТЛ до назначения специфического лечения [Мишин В. Ю. и соавт., 2004; Kirman J. et al., 2009; Legrand F. et al., 2009; Михеева О. М. и соавт., 2010; Melo R. C. N. et al., 2010]. Все исследователи, описывающие высокое содержание эозинофилов в периферической крови у больных ТЛ, лишь констатируют факт гемической эозинофилии, не акцентируясь на механизмах формирования и биологической целесообразности данной гематологической реакции при туберкулезной инфекции [Kirman J. et al., 2009]. Известно, что эозинофилы являются агрессивными клетками, цитотоксический потенциал которых за счет различных механизмов микробицидности может быть направлен в отношении разнообразных антигенных структур, в том числе и *Mycobacterium tuberculosis* [Rothenberg M. E. et al., 2007; Driss V. et al., 2009; Melo R. C. N. et al., 2010; Cook E. B. et al., 2012].

Формирование эозинофилии крови при патологических процессах связывают с гиперпродукцией ключевых медиаторов пролиферации, дифференцировки и рекрутирования эозинофильных гранулоцитов – интерлейкина 5 (IL-5) и эотаксина, индуцирующих при взаимодействии со специфическими клеточными рецепторами (IL-5RA и CCR3) хемотаксис и эффекторные функции клеток [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, оказывающих влияние на активность цитокинов и их рецепторов у отдельного индивида, является аллельный полиморфизм иммунорегуляторных генов. Необходимо отметить, что наибольшее количество аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов установлено для их промоторов. Мутации в промоторах, влияя на уровень экспрессии контролируемого гена, не изменяют структуру кодируемых генами продуктов [Кононенко В. И. и соавт., 2006; Pullat et al., 2007]. В современной литературе представлены многочисленные данные о наличии ассоциативных связей аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с характером экспрессии соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к той или иной патологии [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, показано, что полиморфные сайты *C-703T* гена *IL5*, *G-80A* гена *IL5R*, *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3* ассоциированы с уровнем продукции соответствующих цитокинов, экспрессией рецепторов и количеством эозинофилов в периферической крови [Карпова А. В., 2009; Al-Abdulahadi S. A. et al., 2010; Wang T.-N. et al., 2010; Innoue N. et al., 2011].

В свете изложенного представляется весьма актуальным изучение роли IL-5 и эотаксина в ассоциации с экспрессией комплементарных рецепторов и генетическим полиморфизмом вышеназванных ключевых медиаторов, регулирующих гомеостаз системы эозинофильных гранулоцитов, в развитии гемической эозинофилии при туберкулезной инфекции.

Цель исследования: охарактеризовать молекулярно-генетические механизмы формирования эозинофилии крови при туберкулезе легких.

Задачи исследования:

1. Оценить содержание IL-5 (в крови, супернатантах культуральных суспензий интактных и VCG-индуцированных эозинофилов), эотаксина (в крови) и экспрессию на эозинофилах комплементарных им рецепторов (*IL5RA*, *CCR3*) у больных туберкулезом легких с эозинофилией и без таковой.

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

3. Оценить значение IL-5 и эотаксина, экспрессируемых эозинофилами рецепторов (*IL5RA*, *CCR3*) и полиморфизма их генов в развитии эозинофилии при туберкулезе легких.

4. Охарактеризовать параметры Th1- и Th2-ассоциированного иммунного ответа у больных туберкулезом легких с эозинофилией крови.

Научная новизна. Впервые проведено исследование молекулярно-генетических механизмов формирования эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких. Показано, что эозинофилия, сопровождающая течение туберкулеза легких, обусловлена повышением содержания IL-5 и эотаксина в крови, гиперсекрецией IL-5 и активацией экспрессии комплементарных ему рецепторов (IL-5RA) эозинофильными гранулоцитами. Оценена связь аллельного полиморфизма генов (*IL5*, *IL5RA*, *эотаксина* и *CCR3*) с концентрацией соответствующих цитокинов, экспрессией цитокиновых рецепторов и количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической

крови при туберкулезе легких. Показано, что эозинофилия крови при туберкулезе легких сопряжена с носительством генотипов *CC (C-703T)* гена *IL5*, *GG (A-384G)* гена *эотаксина* и *CC (T-51C)* гена *CCR3*. Установлена ассоциация генотипов *CC (C-703T)* гена *IL5* и *GG (A-384G)* гена *эотаксина* с повышенным содержанием ИЛ-5 и эотаксина в крови у больных туберкулезом легких. При этом выявлено, что увеличение числа ИЛ-5РА-позитивных эозинофилов в крови при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией, не связано с аллельным полиморфизмом *G-80A* гена *IL5RA*. Впервые проведен анализ отдельных параметров клеточного (Th1-ассоциированного) и гуморального (Th2-ассоциированного) иммунного ответа у больных туберкулезом легких в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови. Установлено, что эозинофилия при туберкулезе легких сочетается с повышением абсолютного содержания CD20⁺ В-лимфоцитов и концентрации ИЛ-5 в условиях дефицита IFN-γ в крови, что может свидетельствовать о способности эозинофилов при повышении их количества смещать Th1/Th2-баланс, поляризуя иммунный ответ в направлении гуморальных (Th2-ассоциированных) реакций.

Практическое и теоретическое значение работы. Полученные данные фундаментального характера значительно расширяют представления о молекулярно-генетических механизмах формирования эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких. Результаты исследования аллельного полиморфизма генов (*IL5*, *IL5RA*, *эотаксина*, *CCR3*) в ассоциации с концентрацией соответствующих цитокинов в крови и экспрессией их рецепторов представляются актуальными для формирования новых знаний о генетически детерминированном развитии гемической эозинофилии при туберкулезной инфекции с целью разработки патогенетически обоснованных способов коррекции данной гематологической реакции.

Положения, выносимые на защиту:

1. Эозинофилия у больных туберкулезом легких до лечения противотуберкулезными препаратами сопряжена с гиперсекрецией эозинофильными гранулоцитами ИЛ-5, увеличением содержания эотаксина, ИЛ-5 и ИЛ-5РА-экспрессирующих эозинофилов в крови, а также с носительством аллеля *C* и генотипа *CC (C-703T)* гена *IL5*, аллеля *G* и генотипа *GG (A-384G)* гена *эотаксина* и аллеля *C* и генотипа *CC (T-51C)* гена *CCR3*.
2. Сочетанная роль повышенной секреции ИЛ-5 и экспрессии ИЛ-5РА эозинофилами в развитии гемической эозинофилии при туберкулезе легких

подтверждается отсутствием их у больных без эозинофилии и еще более выраженным повышением при индукции эозинофилов *in vitro* рекомбинантным IL-5 и антигеном (BCG).

3. У больных туберкулезом легких с эозинофилией повышенное содержание IL-5 и эотаксина в крови ассоциировано с генотипами *CC (C-703T)* гена *IL5* и *GG (A-384G)* гена *эотаксина*. При этом увеличение содержания IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в крови не связано с полиморфизмом *G-80A* гена *IL5RA*.
4. Гемическая эозинофилия при туберкулезе легких сочетается с увеличением абсолютного содержания CD20⁺ В-лимфоцитов и концентрации IL-5 в условиях дефицита IFN- γ в крови.

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); XII Российском конгрессе молодых ученых с международным участием «Науки о человеке» (Томск, 2011); 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 – 2012), на научных семинарах кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2010 – 2012).

Исследования проведены при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках грантов для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов медицинских наук (Договор №14.124.13.3383-МК «Роль эозинофильной реакции крови в патогенезе инфекционного процесса», руководитель – канд. мед. наук Ю.В. Колобовникова) и 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).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, из них 8 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов, списка литературы. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 17 таблицами. Библиографический указатель включает 192 источника, из них 61 отечественных и 131 зарубежных авторов.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Соискателем лично выполнены анализ данных литературы по теме диссертации, планирование, постановка цели и задач исследования, пробоподготовка, выделение и культивирование эозинофильных гранулоцитов, иммуноферментный анализ, выделение ДНК, ПДРФ-анализ, статистический анализ результатов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу 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), проживающих на территории г. Томска и Томской области, с распространенными деструктивными формами впервые выявленного туберкулеза легких (ТЛ). Пациенты находились на стационарном лечении во фтизиатрическом отделении №1 (зав. отд. – О. И. Новосельцева) Томской областной туберкулезной клинической больницы (гл. врач - канд. мед. наук Г. В. Янова).

Диагноз ТЛ устанавливался на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты.

Для решения поставленных задач были сформированы две основные группы исследования: первую группу составили 102 больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, вторую – 115 больных ТЛ без эозинофилии. Внутри каждой группы были сформированы подгруппы больных с инфильтративным (146 человек) и диссеминированным (71 человек) ТЛ. Оценка ассоциаций носительства отдельных полиморфизмов генов с изменением цитокинопродукции и экспрессии рецепторов на мембране эозинофильных гранулоцитов *in vitro* проводилась у больных ТЛ с учетом

наличия либо отсутствия у них гемической эозинофилии.

Инфильтративный туберкулез легких (ИТЛ) был диагностирован у 146 (67,3%) пациентов и характеризовался на рентгенограмме наличием одной или нескольких неоднородных теней туберкулезного инфильтрата диаметром от 5 до 7 см с очагами распада и обсеменения.

Диссеминированный туберкулез легких (ДТЛ) был выявлен у 71 (32,7%) больных, рентгенологическим признаком которого являлось наличие в одном или обоих легких мелких и среднеочаговых изменений неоднородной структуры за счет инфильтрации и распада.

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

Критериями исключения больных ТЛ из исследования служили возраст менее 18 или более 55 лет, проведение вакцинации или ревакцинации (в течение менее 3-х лет до момента начала исследования), менее 3-х месяцев назад перенесенная инфекция, острые и хронические (в стадии обострения) сопутствующие инфекционные и соматические заболевания.

В контрольную группу были включены 120 здоровых доноров (91 мужчина и 29 женщин) с сопоставимыми характеристиками по возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля, не имеющие в анамнезе хронических инфекционных заболеваний.

Все обследованные лица отрицали наличие в анамнезе аллергических заболеваний, в том числе лекарственной и пищевой аллергии, и отягощенной наследственности. При проведении иммуноферментного анализа у всех обследованных лиц диагностически значимых титров антител (иммуноглобулинов класса G) к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков в крови не было выявлено.

Определение общего количества лейкоцитов в периферической крови и подсчет лейкоцитарной формулы проводили общепринятыми гематологическими методами.

Выделение эозинофильных гранулоцитов из периферической крови выполняли на ступенчатом градиенте плотности Percoll ($\rho=1,133$ г/л) («SigmaLifeScience», США).

Определение концентрации IL-5 в супернатантах культуральных суспензий, а также содержания IL-5, IFN- γ и зотаксина в крови проводили с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода. Процедуру анализа выполняли согласно инструкциям, предлагаемым

производителями тест-систем («Протеиновый контур», Россия; «Biosource», США).

Определение рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксину (CCR3) на эозинофильных гранулоцитах проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентной меткой FITC (Fluorescein isothiocyanat), согласно протоколам фирм-производителей («R&D Systems», США и «Caltag Laboratories», США).

Выделение ДНК из периферической крови проводили сорбентным методом, согласно инструкции, прилагаемой к набору «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия).

Исследование полиморфных участков генов цитокинов и их рецепторов проводили с использованием рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома (ПДРФ-анализ).

Амплификацию осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к набору «АмплиСенс PCR» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эппендорф» путём полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе, учитывая применение амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия). Было исследовано четыре полиморфных сайта: *C-703T* гена *IL5*, *G-80A* гена *IL5RA*, *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3*. Амплификат подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой. Визуализацию продуктов амплификации и рестрикции исследуемых генов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле.

Определение CD3⁺- и CD20⁺-лимфоцитов в периферической крови проводили лимфоцитотоксическим методом с использованием наборов моноклональных антител (ООО «Сорбент», Россия).

Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета программ Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли по критерию Шапиро-Уилка *W*. Для оценки достоверности различий выборок, подчиняющихся закону нормального распределения, использовали *t*-критерий Стьюдента, не имеющих нормального распределения – *U*-критерий Манна-Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p \leq 0,05$. С целью выявления взаимосвязей между показателями применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*r*) [Боровиков В. В., 2001]. Распределение генотипов по исследуемым полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью точного

теста Фишера. Для сравнения частот аллелей 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

Содержание эозинофилов в периферической крови при туберкулезе легких (ТЛ) может варьировать от повышенного до анэозинофилии [Rothenberg M. E., 2007; Simon D. et al., 2007]. Большинство исследователей связывают развитие эозинофилии крови лишь с побочным действием проводимой противотуберкулезной химиотерапии и исходной аллергической настроенностью организма. Согласно результатам анализа медицинских карт пациентов, находящихся на стационарном лечении во фтизиатрическом отделении №1 (зав. отд. – О. И. Новосельцева) Томской областной туберкулезной клинической больницы (гл. врач – канд. мед. наук Г. В. Янова), эозинофильная реакция крови регистрировалась в 30% случаев туберкулезной инфекции (30 человек на 100 обследованных лиц) на фоне проводимой специфической химиотерапии препаратами основного (первого) ряда (изониазид, рифампицин, стрептомицин, пипразинамид и этамбутол).

Наряду с лекарственной эозинофилией, в клинической практике врачей-фтизиатров нередко регистрируются случаи эозинофильной реакции крови у больных ТЛ до назначения специфической терапии. В ходе настоящего исследования умеренная эозинофилия крови (абсолютное содержание эозинофилов $(0,921 \pm 0,120) \times 10^9/\text{л}$) регистрировалась в 18% случаев ТЛ до назначения противотуберкулезных препаратов. Максимальное увеличение абсолютного числа эозинофилов (до $2,020 \times 10^9/\text{л}$) было зарегистрировано у больных с диссеминированной формой ТЛ.

Изучение молекулярных механизмов формирования реактивной эозинофилии крови при патологии, в том числе при ТЛ, предполагает оценку ключевых факторов, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов: IL-5 и эотаксина. Эти медиаторы принимают активное участие в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза, дегрануляции, осуществлении механизмов цитотоксичности и хемотаксиса лейкоцитов эозинофильного ряда [Morshed M. et al., 2012].

Эозинофилактивирующие свойства IL-5 подтверждались и в ходе настоящего исследования, согласно результатам которого достоверное повышение концентрации IL-5 в крови было зарегистрировано лишь у

пациентов с инфильтративным ТЛ (ИТЛ) и диссеминированным ТЛ (ДТЛ), ассоциированными с эозинофилией, тогда как содержание данного медиатора в крови у больных ТЛ без эозинофилии не отличалось от контрольных значений (табл. 1).

Таблица 1

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

Группы обследованных лиц		ИЛ-5	Эотаксин
Здоровые доноры		7,99 (7,56-19,44)	25,19 (18,27-34,31)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	52,96 (35,65-64,81) $p_1 < 0,05$	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 (8,64-36,73) $p_2 < 0,05$	28,21 (25,37-37,96) $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	8,22 (7,31-10,81) $p_2 < 0,05$	39,56 (29,45-48,51) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание: p_1 (здесь и далее в табл.) – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p_3 – у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких.

Повышенный уровень ИЛ-5 в крови у больных ТЛ с эозинофилией может поддерживаться за счет секреторной активности многих клеток-продуцентов данного цитокина: Th2-лимфоцитов, В-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток – основных участников противотуберкулезного иммунного ответа. ИЛ-5 способны секретировать и сами эозинофильные гранулоциты [Lintomen L. et al., 2007; Johnson V. J. et al., 2008; Mirza S. et al., 2010; Wise E. L. et al., 2010]. Как показали результаты проведенного исследования, содержание ИЛ-5 в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов оказалось повышенным лишь у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови (табл. 2).

Помимо оценки базальной продукции ИЛ-5 проводилась инкубация эозинофильных гранулоцитов с вакцинным штаммом BCG *in vitro*. В ходе проведенного исследования BCG-индуцированная секреция ИЛ-5 в *in vitro*

культуре эозинофилов периферической крови оказалась достоверно выше у пациентов с ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров и у пациентов с ТЛ без эозинофилии (табл. 2).

Таблица 2

Содержание IL-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов (пг/мл) у больных туберкулезом легких с эозинофилией (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	Культура эозинофилов крови <i>in vitro</i>	
	Интактная	BCG-индуцированная
Здоровые доноры	6,225 (3,131-10,753)	9,157 (4,510-12,618) p ₃ <0,05
Инфильтративный	15,617 (14,696-19,080) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05	28,273 (26,834-31,081) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ <0,05
Диссеминированный	14,565 (11,673-17,345) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05	27,589 (24,736-28,604) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05; p ₃ <0,05

Примечание: p₂ – по сравнению с группой больных туберкулезом легких без эозинофилии; p₃ – с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Реактивный характер эозинофилии крови при ТЛ подтверждается также результатами количественной оценки другого эозинофил-активирующего медиатора – эотаксина. В ходе настоящего исследования было зарегистрировано значительное повышение содержания эотаксина в крови у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 1).

Известно, что эозинофильные гранулоциты выступают в качестве активных продуцентов эотаксина, избыточная концентрация которого может активировать механизмы, обеспечивающие накопление эозинофилов в крови. Однако у больных ДТЛ без эозинофилии концентрация эотаксина в крови оказалась сопоставимой с таковой у больных ТЛ, в крови которых количество эозинофилов превышало норму (табл. 1).

Одним из возможных факторов избыточного содержания эотаксина в крови у больных ТЛ может быть опосредованное влияние IL-4 и IL-13, которые в дозозависимости стимулируют экспрессию мРНК эотаксина в фибробластах кожи [Atasoy U. et al., 2003; Zafra M. P. et al., 2012].

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что повышенный уровень эотаксина в крови, зарегистрированный у пациентов с ТЛ независимо от наличия эозинофильной реакции крови, подтверждает скорее хемотаксические свойства этого медиатора, способного вызывать миграцию клеток в зону гранулематозного воспаления. В связи с этим, в качестве

основного фактора эозинофилии при ТЛ, по-видимому, следует рассматривать, прежде всего, IL-5, концентрация которого в крови была повышенной лишь у пациентов с эозинофилией (табл. 1).

Общеизвестно, что действие цитокинов реализуется при взаимодействии со специфическими их рецепторами на поверхности клеток-мишеней [Kabesch M. et al., 2007]. При изучении механизмов формирования эозинофилии крови несомненный интерес представляет оценка экспрессии рецепторов для эозинофил-специфичных цитокинов (IL-5 и эотаксина), количество которых значительно возрастает на мембране клетки после ее активации антигеном [Rothenberg M. E. et al., 2007].

С использованием метода проточной цитофлуориметрии нами была проведена оценка *in vitro* экспрессии на эозинофилах, выделенных из крови больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови и без таковой, рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксину (CCR3). В результате было показано достоверное повышение количества эозинофилов, несущих IL-5RA, в интактной культуре клеток у больных с эозинофилией при ИТЛ (абсолютное содержание $0,209 (0,118-0,270) \times 10^6/\text{мл}$; относительное – 20,86 (16,20-23,35) %) и ДТЛ (абсолютное содержание $0,292 (0,198-0,386) \times 10^6/\text{мл}$; относительное – 14,61 (9,89-19,32) %), что может быть связано с опосредованным влиянием комплементарного цитокина, избыточные концентрации которого были обнаружены в крови лишь у пациентов данных групп.

При добавлении в культуру клеток рекомбинантного IL-5 (rIL-5) повышение содержания IL-5RA⁺ эозинофилов устанавливалось у всех больных ТЛ независимо от наличия эозинофильной реакции крови. При определении соотношения числа клеток, несущих IL-5RA, в базальной и rIL-5-индуцированной культуре было показано увеличение индекса стимуляции 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.

Анализ содержания CCR3-экспрессирующих эозинофилов у больных ТЛ позволил установить его увеличение в интактной культуре клеток *in vitro* лишь в группе пациентов без эозинофильной реакции крови. Известно, что CCR3 *in vivo* опосредует хемотаксис эозинофилов в ткани при действии эотаксина [Miyagaki T. et al., 2010; Tedeschi A. et al., 2012]. По всей видимости, повышенное число эозинофильных лейкоцитов, экспрессирующих CCR3, в сочетании с высоким уровнем эотаксина в крови у больных ТЛ без

эозинофилии указывает на ключевую роль комплекса «эотаксин – CCR3» в механизмах рекрутирования эозинофилов в зону гранулематозного воспаления.

В ходе настоящего исследования у больных ИТЛ с эозинофилией и у пациентов без эозинофильной реакции крови также было зарегистрировано увеличение количества CCR3-позитивных эозинофилов в культуре клеток с IL-5 относительно их базального уровня. Индексы стимуляции экспрессии CCR3 у пациентов данных групп были сопоставимыми с нормой. Полученные результаты свидетельствуют о сохранении резерва рецептор-экспрессирующей способности эозинофильных гранулоцитов у больных ТЛ.

Таким образом, анализ ключевых эозинофил-активирующих медиаторов, реализующих свое действие через специфические рецепторы, позволяет заключить, что высокое содержание IL-5 в периферической крови и гиперэкспрессия IL-5RA на мембране эозинофилов составляют основу пролонгированного пребывания эозинофильных лейкоцитов в кровотоке при туберкулезной инфекции.

Анализируя причины повышенного содержания эозинофил-активирующих цитокинов в крови и количества эозинофилов, несущих IL-5RA и CCR3, у больных ТЛ, необходимо учитывать тот факт, что уровень медиаторов, выделяемых клетками, и уровень экспрессии их рецепторных структур генетически детерминированы. В литературе представлены многочисленные данные о наличии ассоциативных связей аллельных вариантов генов цитокинов с характером экспрессии соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к той или иной патологии [Фрейдин М.Б. и соавт., 2004; June-Hyuk Lee et al., 2007; Namkung J. H. et al., 2007].

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

Известно, что в промоторной области гена *IL5* идентифицирован полиморфный сайт в положении *-703*, единичная замена нуклеотида в котором оказывает влияние на наработку белкового продукта. В ходе настоящего исследования у больных ТЛ было установлено изменение распределения аллельных вариантов полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5*, заключающееся в преобладании гомозиготного генотипа *CC* над гетерозиготным *CT* и гомозиготным *TT* генотипами. При статистическом исследовании были показаны значимые различия в распределении генотипов между здоровыми

донорами и больными ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, а также между больными ТЛ с эозинофилией и без нее (табл. 3).

Таблица 3

Распределение генотипов и аллелей полиморфизмов 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
<i>C-703T</i> гена <i>IL5</i>	<i>CC</i>	49,2% (59)	67,6% (69)	10,37 $p_1 < 0,05$	50,4% (58)	3,31 $p_1 > 0,05$ 6,61 $p_2 < 0,05$
	<i>CT</i>	44,2% (53)	23,5% (24)		36,5% (42)	
	<i>TT</i>	6,7% (8)	8,8% (9)		13,0% (15)	
	<i>C</i>	71,3%	79,4%	3,92 $p_1 = 0,05$	68,7%	0,36 $p_1 > 0,05$ 6,41 $p_2 < 0,05$
	<i>T</i>	28,8%	20,6%		31,3%	
<i>G-80A</i> гена <i>IL5RA</i>	<i>GG</i>	52,5% (63)	54,9% (56)	4,38 $p_1 > 0,05$	57,4% (66)	0,91 $p_1 > 0,05$ 2,21 $p_2 > 0,05$
	<i>GA</i>	42,5% (51)	33,3% (34)		36,5% (42)	
	<i>AA</i>	5,0% (6)	11,8% (12)		6,1% (7)	
	<i>G</i>	73,75%	71,6%	0,26 $p_1 > 0,05$	75,7%	0,22 $p_1 > 0,05$ 0,93 $p_2 > 0,05$
	<i>A</i>	26,25%	28,4%		24,3%	
<i>A-384G</i> гена <i>эотаксина</i>	<i>AA</i>	58,3% (70)	44,1% (45)	10,18 $p_1 < 0,01$	51,3% (59)	2,12 $p_1 > 0,05$ 3,33 $p_2 > 0,05$
	<i>AG</i>	32,5% (39)	31,4% (32)		33,9% (39)	
	<i>GG</i>	9,2% (11)	24,5% (25)		14,8% (17)	
	<i>A</i>	74,6%	59,8%	11,03 $p_1 < 0,001$	68,3%	2,30 $p_1 > 0,05$ 3,37 $p_2 > 0,05$
	<i>G</i>	25,4%	40,2%		31,7%	
<i>T-51C</i> гена <i>CCR3</i>	<i>TT</i>	51,7% (62)	42,2% (43)	6,10 $p_1 = 0,05$	56,5% (65)	0,94 $p_1 > 0,05$ 10,85 $p_2 < 0,01$
	<i>TC</i>	34,2% (41)	30,4% (31)		33,1% (38)	
	<i>CC</i>	14,2% (17)	27,5% (28)		10,4% (12)	
	<i>T</i>	68,8%	57,4%	6,18 $p_1 = 0,01$	73,0%	1,05 $p_1 > 0,05$ 11,81 $p_2 < 0,001$
	<i>C</i>	31,2%	42,6%		27,0%	

Примечание: p_2 – по сравнению с группой больных туберкулезом легких с эозинофилией.

Проведенный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *C-703T* гена *IL5* позволил установить при ТЛ положительную ассоциацию гомозиготного генотипа *CC*, а также аллеля *C* с эозинофильной реакцией крови

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

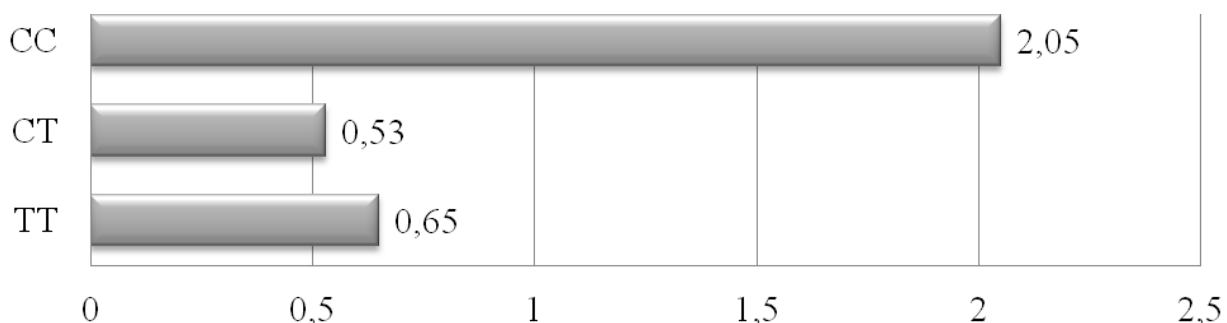


Рис. 1. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5*. Слева генотипы полиморфного сайта *C-703T*, справа – значения критерия отношения шансов (*OR*)

В ходе исследования зависимости концентрации *IL-5* в крови от варианта полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5* было установлено, что у индивидов с генотипом *CC* полиморфизма *C-703T* гена *IL5* она достоверно превышала таковую у пациентов с генотипами *CT* и *TT*. Таким образом, у больных ТЛ генотип *CC* полиморфного сайта *C-703 T* гена *IL5* ассоциирован с повышенным содержанием *IL-5* в крови.

Как упоминалось ранее, действие *IL-5* осуществляется посредством связывания со специфическим рецептором *IL-5RA*. Проведенное исследование полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA* не выявило 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 наличия эозинофильной реакции крови (табл. 3). Анализ зависимости содержания *IL-5RA*-позитивных эозинофилов от варианта полиморфного сайта *G-80A* соответствующего гена также не выявил каких-либо достоверных различий у больных ТЛ – носителей разных генотипов.

Другим кандидатом, ответственным за развитие эозинофильной реакции крови, является эотаксин. В ходе проведенного иммуногенетического анализа полиморфизма *A-384G* гена эотаксина было установлено, что среди пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно чаще встречались носители гомозиготного генотипа *AA*, реже – носители гомозиготного генотипа *GG* (табл. 3). Зарегистрированы статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного сайта *A-384G* гена эотаксина у больных ТЛ с эозинофилией и у здоровых доноров. Кроме того,

найдена положительная ассоциация аллеля *G* и генотипа *GG* (*A-384G*) гена *эотаксина* с эозинофилией при ТЛ, что свидетельствует о предрасполагающем влиянии данного полиморфизма к формированию эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции (рис. 2).

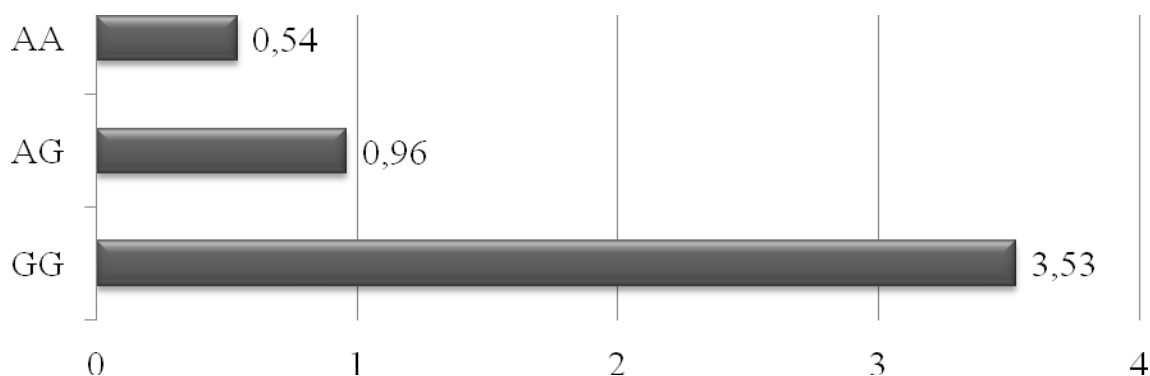


Рис. 2. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа локуса *A-384 G* гена *эотаксина*. Слева генотипы полиморфного сайта *A-384 G*, справа – критерий отношения шансов (OR)

При анализе концентрации *эотаксина* в крови в зависимости от аллельных вариантов полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* 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 *эотаксина* в крови. Следовательно, наличие у больного ТЛ генотипа *GG* полиморфного сайта *A-384G* гена *эотаксина* в ассоциации с повышенным содержанием *эотаксина* в крови может лежать в основе развития эозинофилии при туберкулезной инфекции.

Как упоминалось ранее, действие *эотаксина* осуществляется через специфический рецептор *CCR3*, экспрессированный 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*.

Анализ зависимости содержания *CCR3*-позитивных эозинофилов в *in vitro* культуре эозинофилов крови от варианта полиморфного сайта *T-51C* соответствующего гена не выявил каких-либо достоверных различий у больных ТЛ – носителей разных генотипов. Следовательно, аллельный полиморфизм *T-*

51С гена *CCR3* не оказывает существенного влияния на уровень экспрессии рецептора к эотаксину. Описанные выше изменения количества эозинофилов, несущих рецептор к эотаксину, у больных ТЛ, по всей видимости, не связаны с исследуемым полиморфизмом гена *CCR3*.

Следует отметить, что на сегодняшний день не существует единого мнения о целесообразности возникновения и значении эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции. Для уточнения влияния эозинофильной реакции крови на течение инфекционного процесса, вызванного *M. tuberculosis*, на втором этапе настоящего исследования была проведена сравнительная оценка отдельных параметров клеточного (Th1-ассоциированного) и гуморального (Th2-ассоциированного) иммунного ответа у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и без эозинофилии.

Как показали результаты проведенного исследования, абсолютное содержание лимфоцитов 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).

В целом снижение содержания $CD3^+$ Т-лимфоцитов при ДТЛ можно рассматривать как проявление Т-клеточного дефицита, связанного с угнетением формирования клона антиген-специфичных Т-лимфоцитов, либо с их быстрой элиминацией из периферической крови в очаг воспаления или посредством индукции апоптоза [Воронкова О. В. и соавт., 2007]. Вместе с тем, дефицит $CD3^+$ Т-лимфоцитов может быть опосредован развивающимся в ходе длительной персистенции *M. tuberculosis* дисбалансом продукции цитокинов.

Ключевым цитокином, обеспечивающим протекцию при туберкулезной инфекции, является IFN- γ , обладающий способностью повышать антигенпрезентирующую и микробицидную функции макрофагов и усиливать цитотоксические реакции, опосредованные Т-лимфоцитами и НК-клетками [Салина Т. Ю. и соавт., 2012]. При этом в ходе проведенного исследования было зарегистрировано статистически значимое снижение концентрации IFN- γ в крови у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией (6,15 (3,86-7,31)

пг/мл у больных ИТЛ и 4,95 (3,86-6,21) пг/мл у больных ДТЛ), и найдена отрицательная корреляция между количеством IFN- γ и эозинофильных гранулоцитов в крови ($r=-0,731$, $p<0,05$). Вероятно, это обусловлено гиперпродукцией Th2-ассоциированных иммунорегуляторных цитокинов, подавляющих пролиферацию Th1-лимфоцитов и секрецию ими основных медиаторов противотуберкулезного иммунитета.

Необходимо отметить, что в комплексе защитных реакций при ТЛ механизмы гуморального иммунного ответа играют немаловажную роль, однако поляризация иммунного ответа в направлении Th2-реакций с одновременным угнетением Th1-ответа – фактор неблагоприятный, способствующий прогрессированию патологического процесса. Так, в ходе настоящей работы у больных ТЛ с эозинофильной реакцией было установлено статистически значимое повышение абсолютного числа CD20⁺ В-лимфоцитов (до $(0,59\pm 0,04)\times 10^9$ /л у больных ИТЛ и $(0,53\pm 0,09)\times 10^9$ /л у больных ДТЛ) и найдена положительная корреляция между их количеством и содержанием эозинофильных гранулоцитов в крови ($r=0,620$, $p<0,05$). Выраженные изменения содержания CD20⁺ В-лимфоцитов именно у больных ТЛ с эозинофилией могут быть обусловлены, в том числе, влиянием IL-5, концентрация которого в крови у данной группы пациентов оказалась достоверно выше таковой у больных без эозинофилии. В частности R. G. Wolterink et al. [2012] показана способность IL-5 влиять не только на эозинофилы, но и усиливать пролиферацию и дифференцировку активированных В-лимфоцитов, продукцию ими цитокинов и иммуноглобулинов.

Подводя итог полученным результатам, следует заключить, что эозинофильная реакция крови при ТЛ носит реактивный характер, механизм формирования которой опосредован гиперсекрецией клетками крови ключевых эозинофил-активирующих медиаторов (IL-5 и эотаксина), а также избыточной экспрессией IL-5RA на мембране эозинофильных гранулоцитов (рис. 3). Предрасполагающим фактором к развитию гемической эозинофилии при ТЛ является носительство генотипов *CC* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5* и *GG* полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина*, ассоциированных с гиперпродукцией IL-5 и повышением содержания IL-5 и эотаксина в крови, т.е. эозинофильная реакция крови при туберкулезной инфекции может иметь генетически детерминированный характер. Th2-поляризацию иммунного ответа при ТЛ, ассоциированную с эозинофильной реакцией крови, следует рассматривать, по-видимому, как следствие эозинофилии (в виду

гиперсекреции эозинофилами IL-5), а также как фактор ее прогрессирования. В целом, полученные в настоящем исследовании результаты существенно расширяют представления о механизмах развития эозинофилии крови при ТЛ и могут явиться основой для разработки критериев прогноза течения и иммунотерапии данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Эозинофильная реакция крови при инфильтративном и диссеминированном туберкулезе легких до проведения химиотерапии опосредована увеличением содержания эотаксина, IL-5 и числа IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в крови.
2. Ведущая роль IL-5 и рецептора к IL-5 (IL-5RA) в развитии гемической эозинофилии при туберкулезе легких подтверждается увеличением секреции цитокина *in vitro*, содержания его и IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в крови только у больных с эозинофилией, в то время как повышенное содержание эотаксина и CCR3⁺ эозинофилов в крови выявляется у больных с эозинофилией и без таковой.
3. Повышенная реактивность (гиперэргия) эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких с эозинофилией проявляется в условиях индукции *in vitro* увеличением секреции клетками IL-5 (при действии BCG) и экспрессии IL-5RA (при действии рекомбинантного IL-5). При этом изменения со стороны экспрессии CCR3 отсутствуют.
4. Развитие эозинофильной реакций крови при туберкулезе легких ассоциировано с аллелем *C* и генотипом *CC* (*C-703T*) гена *IL5*, аллелем *G* и генотипом *GG* (*A-384G*) гена эотаксина, аллелем *C* и генотипом *CC* (*T-51C*) гена *CCR3*.
5. Повышенное содержание IL-5 и эотаксина в крови у больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, сопряжено с носительством генотипа *CC* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5* и генотипа *GG* полиморфизма *A-384G* гена эотаксина. Гиперэкспрессия на эозинофилах рецепторов к IL-5 и эотаксину не связана с полиморфными вариантами *G-80A* гена *IL5RA* и *T-51C* гена *CCR3*.
6. Увеличение абсолютного количества CD20⁺ В-лимфоцитов и концентрации IL-5 в условиях дефицита IFN- γ в крови у больных туберкулезом легких с гемической эозинофилией свидетельствует о Th2-поляризации иммунного ответа.

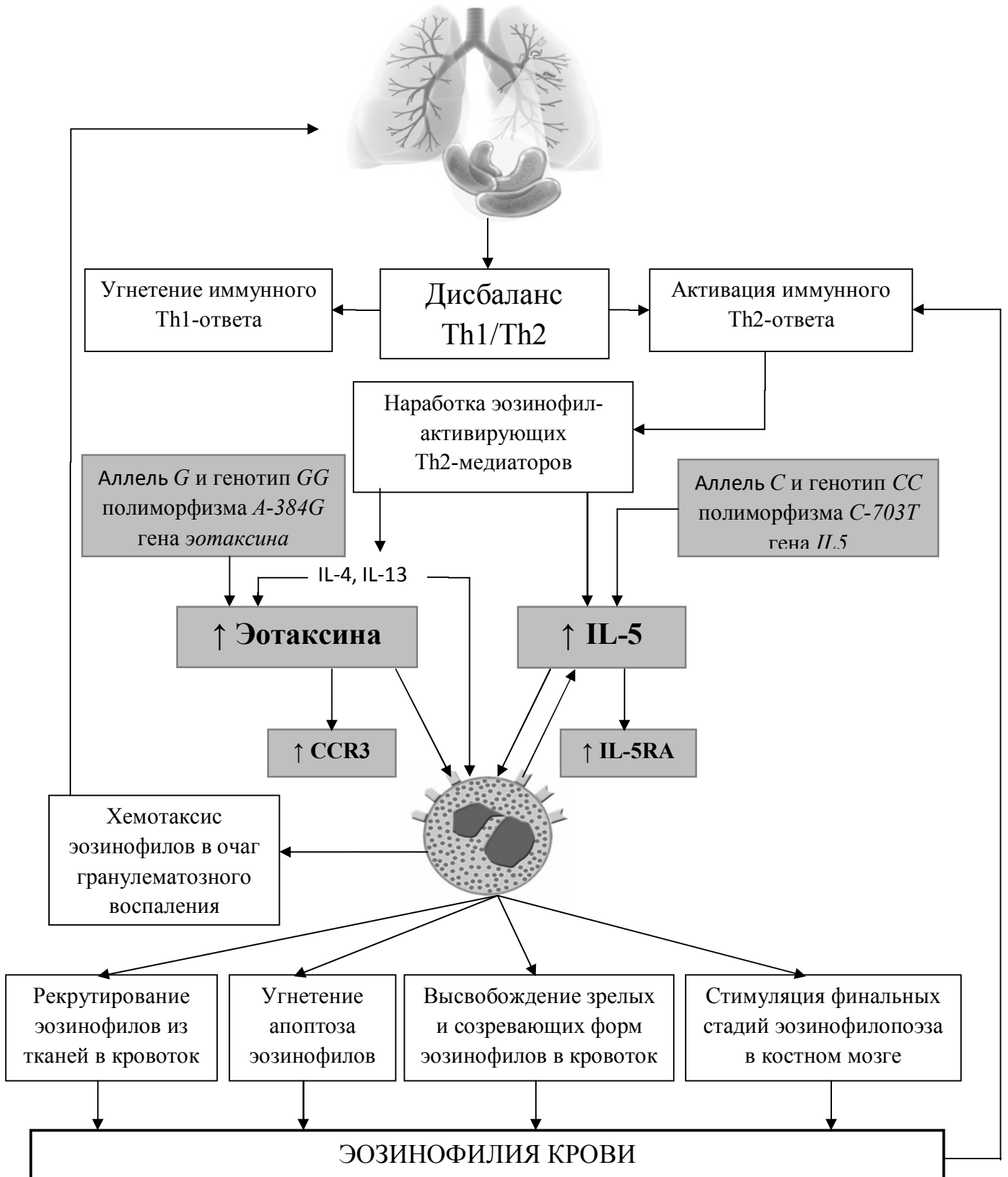


Рис. 3. Молекулярно-генетические механизмы развития эозинофилии при туберкулезе легких (по данным О. В. Воронковой и соавт., 2007; И. В. Лядовой, В. Я. Гергерт, 2009; М. Е. Rothenberg et al., 2007; Н. F. Rosenberg et al., 2009; R. Shamri et al., 2010 и результатам собственных исследований (выделено серым цветом))

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких / Е.Л. Никулина, К.О. Михеева, Н.А. Сухаленцева и др. // *Материалы XV межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии»*, г. Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2009 г. – СПб., 2009. – С. 85-86.
2. Аллельный полиморфизм гена *IFNG* при туберкулезе легких / Е.Л. Никулина, И.О. Наследникова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова, В.В. Новицкий, Е.В. Некрасов, О.В. Филинчук, Е.Г. Чурина, К.О. Михеева, Р.Р. Хасанова, В.А. Серебрякова, Н.А. Сухаленцева // **Медицинская иммунология** (0,271). – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 259-264.
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»*, г. Новосибирск, 15-17 сентября 2010 г. – Новосибирск, 2010. – № 3. – С. 70-71.
4. 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»*, г. Новосибирск, 8-9 декабря 2010 г. – Новосибирск, 2010. – С. 226-228.
5. 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 // **Имунопатология, аллергология, инфектология** (0). – 2011. – № 2. – С.12-17.
6. 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** (0,271). – 2011. – Т. 13, № 2-3. – С. 273-278.
7. 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»*, г. Санкт-Петербург, 3-4 февраля 2011 г. – СПб., 2011. – С. 89.
8. 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»*, г. Санкт-Петербург, 20-21 апреля 2011 г. – СПб., 2011. – С. 110-112.
9. 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, г. Москва, 1-3 июня 2011 г. – **Туберкулез и болезни легких** (0,341). – 2011. – № 4. – С. 199.

10. 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»**, г. Томск, 26-27 мая 2011 г. – Томск, 2011. – С. 67-68.

11. 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** (0,199). – 2012. – № 1. – С. 39-45.

12. 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** (0,465). – 2012. – Т. 153, № 3. – С. 296-299.

13. 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** (0,375). – 2012. – № 5. – С. 58-62.

14. 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** (0,199). – 2012. – № 4. – С. 57-63.

15. 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. Филинчук, М.Д. Гончаров, И.О. Наследникова // **Бюллетень сибирской медицины** (0,199). – 2012. – № 6. – С.213-215.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких

ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких

МБТ – микобактерии туберкулеза

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ТЛ – туберкулез легких

BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) – бацилла Кальметта-Герена

CCR3 (*C-C chemokine receptor type 3*) – хемокиновый рецептор типа 3

CD (*clusters of differentiation*) – дифференцировочные антигены

FITC (*fluorescein isothiocyanat*) – флуоресцеина изотиоционат

IFN (*interferon*) – интерферон

Ig (*immunoglobulin*) – иммуноглобулин

IL (*interleukin*) – интерлейкин

NK (*natural killers*) – натуральные киллеры

Th – (*T-helpers*) – Т-лимфоциты-хелперы

