

Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

академик РАМН,

Заслуженный деятель науки России

В.В. Новицкий

доктор медицинских наук,

профессор О.И. Уразова

Томск-2013

Содержание

Список сокращений	5
Введение	8
Глава 1. Обзор литературы	17
1.1. Современные представления о туберкулезной инфекции	17
1.1.1. Эпидемиология, этиология и патогенез туберкулеза легких, характеристика основных клинических форм	17
1.1.2. Иммунопатогенез туберкулеза легких: дизрегуляторные взаимодействия клеток врожденного и адаптивного иммунитета	23
1.2. Современный взгляд на кинетику, структуру и функции эозинофильных гранулоцитов	31
1.2.1 Гранулярный аппарат эозинофильных лейкоцитов	34
1.2.2. Рецепторный аппарат эозинофильных гранулоцитов	43
1.2.3. Основные функции эозинофильных гранулоцитов	46
1.3. Эозинофильная реакция крови: определение, классификация, механизмы развития	51
1.3.1. Цитокинопосредованные механизмы формирования эозинофилии крови	56
1.3.2. Структурные основы функционального полиморфизма генов эозинофил-активирующих цитокинов и их рецепторов	64
1.3.3. Связь аллельного полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов с формированием эозинофилии крови при заболеваниях	67
1.4. Значение эозинофильной реакции крови при патологии	72
1.4.1. Роль эозинофилии в патогенезе неинфекционных заболеваний	72
1.4.2. Роль эозинофилии в патогенезе заболеваний инфекционной природы	77
Глава 2. Материал и методы исследования	84
2.1. Общая характеристика клинического материала	84
2.2. Материал исследования	88
2.3. Методы исследования	88
2.3.1. Определение общего количества лейкоцитов в периферической крови	90
2.3.2. Подсчет лейкоцитарной формулы	91

2.3.3. Выделение и культивирование эозинофильных гранулоцитов периферической крови.....	91
2.3.4. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови.....	93
2.3.5. Определение содержания цитокинов в крови и супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов.....	94
2.3.6. Определение мембраносвязанных форм цитокиновых рецепторов на эозинофильных гранулоцитах крови.....	95
2.3.7. Выделение ДНК.....	96
2.3.8. Исследование аллельного полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов.....	97
2.3.9. Определение количества CD9 ⁺ и CD18 ⁺ эозинофилов в периферической крови.....	99
2.3.10. Определение фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов...	101
2.3.11. Определение активности пероксидазы эозинофильных гранулоцитов....	102
2.3.11.1. Определение белка микробиуретовым методом.....	102
2.3.12. Определение CD3 ⁺ и CD20 ⁺ лимфоцитов в периферической крови	103
2.3.13. Определение количества CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ и CD4 ⁺ CD25 ⁻ Foxp3 ⁺ регуляторных Т-клеток в периферической крови.....	104
2.3.14. Определение концентрации суммарных антител к антигенам <i>Mycobacterium tuberculosis</i> в крови.....	105
2.4. Статистический анализ результатов исследования.....	106
Глава 3. Результаты исследования.....	108
3.1. Содержание IL-5 и CCL11 в крови у больных туберкулезом легких.....	110
3.2. Содержание IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких.....	113
3.3. Анализ распределения генотипов и аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов у больных туберкулезом легких.....	119
3.4. Связь аллельного полиморфизма генов с содержанием эозинофил-	124

активирующих цитокинов в крови и IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких.....	
3.5. Содержание CD9 ⁺ и CD18 ⁺ клеток в культуре эозинофилов крови <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких.....	130
3.6. Активность пероксидазы эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких.....	134
3.7. Содержание фагоцитирующих клеток в культуре эозинофильных гранулоцитов <i>in vitro</i> у больных туберкулезом легких.....	136
3.8. Показатели <i>in vitro</i> секреции цитокинов эозинофильными гранулоцитами крови у больных туберкулезом легких.....	138
3.9. Показатели иммунного ответа у больных туберкулезом легких.....	147
3.9.1. Количественные показатели лейкоцитарного звена у больных туберкулезом легких.....	147
3.9.2. Содержание CD3 ⁺ , CD20 ⁺ лимфоцитов и IFN γ в крови у больных туберкулезом легких.....	149
3.9.3. Показатели <i>in vitro</i> секреции IL-2, IL-4, IL-10 и TGF β мононуклеарными лейкоцитами крови у больных туберкулезом легких.....	155
3.9.4. Содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих Foxp3, в периферической крови у больных туберкулезом легких.....	163
3.9.5. Содержание противотуберкулезных антител в крови у больных туберкулезом легких.....	167
3.10. Клинико-рентгенологические показатели больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией.....	168
Глава 4. Обсуждение результатов исследования.....	176
Заключение	245
Выводы	248
Список литературы	250

Список сокращений

- АПК – антигенпрезентирующая клетка
- ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких
- ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких
- МБТ – микобактерии туберкулеза
- ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- п.о. – пара оснований
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ТАЕ-буфер – трис-ацетатный буфер
- ТВЕ-буфер – трис-боратный буфер
- ТЛ – туберкулез легких
- ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
- BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*) – бацилла Кальметта-Герена
- BPI (*Bactericidal Permeability-Increasing protein*) - бактерицидный белок, повышающий проницаемость клеток
- CCL (*chemokine ligand*) – хемокиновый лиганд, содержащий два остатка цистеина подряд
- CCR (*C-C chemokine receptor*) – хемокиновый рецептор
- CD (*clusters of differentiation*) – дифференцировочные антигены
- CTLA (*cytotoxic T-lymphocyte antigen*) – цитотоксический антиген Т-лимфоцитов
- CR (*complement receptor*) – рецептор к компонентам комплемента
- CXCR (*C-X-C chemokine receptor*) – хемокиновый рецептор
- dNTP (*Deoxyribonucleotide triphosphate*) – дезоксирибонуклеотидтрифосфат
- ECP (*eosinophil cationic protein*) – эозинофильный катионный протеин
- EDN (*eosinophil-derived neurotoxin*) – эозинофильный нейротоксин
- EPO (*eosinophil peroxidase*) – эозинофильная пероксидаза
- FITC (*fluorescein isothiocyanat*) – флуоресцеин изотиоционат
- GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
- IFN (*interferon*) – интерферон
- IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*) – индоламин-2,3-диоксигеназа

Ig (immunoglobulin) – иммуноглобулин
 ICAM (intercellular adhesion molecule) – молекулы межклеточной адгезии
 IL (interleukin) – интерлейкин
 HES (hypereosinophilic syndrome) – гиперэозинофильный синдром
 HIV (human immunodeficiency virus) – вирус иммунодефицита человека
 HLA (human leukocyte antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген
 JAK (Janus kinase) – янус киназа
 mRNA (messenger ribonucleic acid) - мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
 MAdCAM (mucosal addressin cell adhesion molecule) – молекулы межклеточной адгезии типа «адрессинов» в слизистых оболочках
 MBP (major basic protein) – главный основной протеин
 M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) – макрофагальный колониестимулирующий фактор
 MCP (macrophage chemotactic protein) – протеин-хемоаттрактант для моноцитов
 MIP (macrophage inflammatory protein) – воспалительный протеин макрофагов
 NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
 NK (natural killers) – натуральные киллеры
 NO (nitric oxide) – оксид азота
 PAF (platelet activated factor) – фактор активации тромбоцитов
 PAMP (patogen associated molecular patterns) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
 PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) – рецептор фактора роста тромбоцитов
 PE (phicoeretrin) – фикоэретрин
 Pg (prostaglandin) – простагландин
 RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) – регуляция активации, экспрессии и секреции нормальных Т-клеток
 MAPK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа
 SNAP (synaptosome-associated protein) – синаптосомальный белок
 SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment receptor) – белки,

осуществляющие слияние внутриклеточных транспортных везикул с клеточной мембраной (экзоцитоз) или органеллой-мишенью

SNP (single-nucleotide polymorphism) – полиморфизм единичных нуклеотидов

STAT (signal transducers and activators of transcription) – сигнальная трансдукция и активация транскрипции

TCR (T-cell receptor) – Т-клеточный антиген-распознающий рецептор

TGF (transforming growth factor) – трансформирующий фактор роста

TLR (Toll-like receptor) – Toll-подобный рецептор

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

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

Treg (regulatory T-cells) – регуляторные Т-клетки

VAMP (vesicle-associated membrane protein) – везикуло-ассоциированный мембранный белок

VCAM (vascular cell adhesion molecule) – молекулы адгезии сосудистого эндотелия

VLA (very late antigen) – антигены на поверхности клеток на поздней стадии клеточной активации

Введение

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]. При этом специалисты, описывающие высокое содержание эозинофилов в периферической крови у таких пациентов, затрудняются однозначно интерпретировать причины и биологический смысл данной гематологической реакции при туберкулезной инфекции.

В 90 % случаев формирование эозинофилии крови при патологии связывают с гиперпродукцией ключевых медиаторов, регулирующих гомеостаз эозинофилов – интерлейкина 5 (IL-5) и эотаксинов. При взаимодействии со специфическими клеточными рецепторами (IL-5R и CCR3) цитокины активируют процессы пролиферации, дифференцировки и рекрутирования эозинофильных гранулоцитов, модулируют эффекторный потенциал 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, определяющих функциональную активность цитокинов и их рецепторов у отдельного индивидуума, является аллельный полиморфизм генов. Замены единичных нуклеотидов в промоторных регионах влияют на скорость транскрипции генов, стабильность и сплайсинг мРНК, обуславливая изменение количества синтезируемого продукта при полном

сохранении его структуры [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 [Hogan S.P. et al., 2008; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Speirs R.S. et al., 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 презентруют на своей поверхности toll-подобные рецепторы (TLR), $\gamma\delta$ T-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; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Speirs R.S. et al., 2009; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Xue F.M. et al., 2012; Esnault S. et al., 2012; Xue F.M. et al., 2012; Reece P. et al., 2013]. Идентифицированы ранее неизвестные компоненты гранул эозинофилов, обладающие антибактериальными и противовирусными свойствами [Yousefi S., 2008].

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 [Kirman J. et al., 2009; Legrand F. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009]. 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?

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., Vochner 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 развитии иммунопатологических изменений 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 клинико-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 ткани 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, отражающих 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 цитокин-секреторной 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 TNFα *in vitro*, активация фагоцитоза в ассоциации с 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 IFNγ 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 TGFβ.

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Современные представления о туберкулезной инфекции

1.1.1. Эпидемиология, этиология и патогенез туберкулеза легких, характеристика основных клинических форм

Туберкулез – это широко распространенное инфекционное заболевание, характеризующееся поражением многих систем макроорганизма. Чаще регистрируется туберкулез легких, который с 1993 года был объявлен Всемирной организацией здравоохранения глобальной опасностью для человечества [Перельман М.И., 1997, 2001; Блум Б.Р., 2002; Левашов Ю.Н., Репин Ю.М., 2008].

В России за последние 20 - 25 лет отмечены значительные изменения уровня регистрируемой заболеваемости туберкулезом легких (ТЛ). Постепенное снижение показателя заболеваемости в 70 - 80 гг. (34,0 случаев на 100 тыс. населения) сменилось в 1991-2000 гг. значительным его ростом в 2,7 раза (до 90,7 в 2000 г.) с последующей стабилизацией в первые годы нового столетия на уровне 82 - 85 (2008 г. - 85,1) [Гашенко А.В., 2008]. В течение последних двух лет заболеваемость ТЛ начала постепенно снижаться, достигнув в 2012 г. значения 77,4 случаев на 100 тыс. населения (в 2011 г. – 82,6) [Хантаева Н.С. и соавт., 2011; Шилова М.В. и соавт., 2012]. При этом в некоторых регионах заболеваемость ТЛ по-прежнему сохраняется на высоком уровне: Дальний Восток (120 заболевших на 100 тыс. населения) и Урал (95,7 человек на 100 тыс.) [Нечаева О.Б. и соавт., 2011].

Эпидемиологическая ситуация по ТЛ в Западной Сибири всегда была более напряженной по сравнению с общероссийской, что, по всей видимости, обусловлено сложными социально-экономическими и природными условиями [Перельман М.И., 2003; Краснов В.А., Урсов И.Г., 2004; Воронкова О.В. и соавт., 2007]. На сегодняшний день Томская область по уровню заболеваемости ТЛ находится вне эпидемии (91,4 человек на 100 тыс.). Однако особую тревогу в регионе вызывает рост открытых бациллярных форм ТЛ, трудоспособный возраст заболевших (25 - 44 года) и увеличение показателя смертности от ТЛ [Мякишева Т.В., Мишин В.Ю., 2011; Филинюк О.В., 2011]. Критерием эпидемиологического неблагополучия по ТЛ в Томской области является также заболеваемость детей. В

2012 г. ТЛ заболело 39 детей в возрасте до 17 лет, средний показатель заболеваемости в данной возрастной группе составил 21,3 на 100 тыс. при 18,9 в среднем по стране [Хантаева Н.С. и соавт., 2011].

Возбудителями туберкулеза у человека является *Mycobacterium tuberculosis* (человеческий вид), *Mycobacterium bovis* (бычий вид) и *Mycobacterium africanum* (промежуточный вид) [Перельман М.И., 2001]. В 90% случаев туберкулез органов дыхания вызывает человеческий вид возбудителя.

Mycobacterium tuberculosis (микобактерия туберкулеза, МБТ) имеет форму слегка изогнутой или прямой палочки, длиной 1-10 мкм и диаметром 0,2-0,6 мкм. Являясь факультативными внутриклеточными микроорганизмами, МБТ не образуют капсулы и эндоспор, не синтезируют эндо- и экзотоксины, не обладают способностью к активному перемещению. Негативное действие на организм обусловлено присутствием липидных и белково-липидных структур в составе стенки микобактерии, а также токсических веществ, высвобождающихся при ее разрушении [Блум Б.Р., 2002; Урсов И.Г., 2003; Лиманский А.П., 2004; Перельман М.И., 2007; Ерохин В.В., 2009].

Вирулентность и патогенность микобактерий определяется, главным образом, присутствием в наружной части их клеточной стенки трехалозо-6,6-димиколата или корд-фактора, способствующего развитию ряда патологических изменений в фагоцитах: препятствует слиянию фагосомы с лизосомами в макрофагах, угнетает энергопроцессы в митохондриях, ингибирует продукцию цитокинов. В то же время, установлено, что корд-фактор совместно с другими липидными компонентами потенцирует гранулемообразование [Авербах М.М., 2011; Plessis N. et al., 2012].

Второе место среди молекул, доминирующих в оболочке МБТ, занимает липоарабиноманнан (ЛАМ), который состоит из трех доменов: полисахаридной сердцевины, фосфотидил-мио-инозитолового якоря и двух типов концевых мотивов (манноолигосахарида - МанЛАМ и фосфоинозиотида - ФИ-ЛАМ). Характер концевых мотивов и фосфатидил-мио-инозитолового якоря является решающим в процессе взаимодействия с макрофагальными и лимфоцитарными мембранными рецепторами. Посредством якоря ЛАМ закрепляется в складках

мембраны клеток. При этом МанЛАМ активирует макрофаги и дендритные клетки через маннозный, а ФИ-ЛАМ – через Toll-like-2-рецептор с последующим выбросом противо- и провоспалительных цитокинов соответственно. Кроме того, МанЛАМ препятствует созреванию фагосом и фаголизосомальному слиянию [Kang P.V. et al., 2005; Welin A. et al. 2008; Авербах М.М., 2011; Kumar D., Rao K. V., 2011; Rohde K. H. et al., 2012].

Согласно данным литературы, МБТ разделяются на несколько семейств. Одним из наиболее распространенных генетически близких групп штаммов *M. tuberculosis* является «пекинское семейство» - W-Beijing [Перельман М.И., 2003; Синьков В.В. и соавт., 2010; Воронкова О.В. и соавт., 2011], впервые идентифицированное в Пекине. География распределения штаммов «пекинского семейства» ТЛ в мире неоднородна, с минимальными значениями заболеваемости в странах Северной и Южной Америки и максимальными – Юго-Восточной Азии (54,7%) и Африки (31,8%) [Синьков В.В. и соавт., 2010; Simeone R. et al., 2012]. В России, особенно в некоторых регионах страны (в Северо-Западном федеральном округе и в Восточной Сибири), штаммы семейства Beijing преобладают среди всех регистрируемых изолятов [Балабанова Я.М. и соавт., 2006; Синьков В.В. и соавт., 2010; Воронкова О.В. и соавт., 2011]. Стремительное распространение в мире штаммов «пекинского семейства» обусловлено рядом их патогенных свойств, определяющих неблагоприятные клинико-эпидемиологические проявления с развитием диссеминации и генерализации туберкулезного процесса. Ключевой негативной характеристикой штаммов семейства Beijing является способность их к быстрому (по сравнению с другими семействами) формированию лекарственной устойчивости [Богун А.Г. и соавт., 2007; Hanekom M. et al., 2007; Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007; Синьков В.В. и соавт., 2010; Дорожкова И.Р., 2012; Синьков В.В., 2012].

На сегодняшний день различают первичную лекарственную устойчивость МБТ у больных, ранее не получавших противотуберкулезных препаратов, при заражении штаммами МБТ с ранее сформированной лекарственной устойчивостью, и вторичную или приобретенную, формирующуюся в процессе противотуберкулезной химиотерапии. Лекарственную устойчивость разделяют

также по спектру на монорезистентность - это нечувствительность к одному противотуберкулезному препарату основного ряда; полирезистентность - устойчивость к двум и более базовым химиопрепаратам, но не к рифампицину и изониазиду одновременно; и мультирезистентность или множественную лекарственную устойчивость одновременно к изониазиду, рифампицину и любому другому противотуберкулезному препарату. В последние годы исследователи отмечают неблагоприятную тенденцию к повышению доли пациентов, выделяющих полирезистентные штаммы МБТ к противотуберкулезным препаратам [Сафарян М.Д., 2008; Зиновьев И.П. и соавт., 2009; Филинюк О.В., 2011]. Особое опасение вызывает возрастание удельного веса первичной лекарственной устойчивости возбудителя к наиболее эффективным средствам терапии туберкулеза - изониазиду и рифампицину. Подобный вариант устойчивости в сочетании с нечувствительностью к другим базовым препаратам обуславливает формирование мультирезистентности МБТ, а в комплексе с устойчивостью к препаратам второго ряда (фторхинолоны и канамицин или капреомицин) - опосредует «обширную» устойчивость МБТ [Сафарян М.Д., 2008; Филинюк О.В., 2011].

В большинстве случаев лекарственная устойчивость является результатом одной или нескольких спонтанных хромосомных мутаций МБТ, которые возникают на фоне неадекватной химиотерапии [Тунгусова О.С., Марьяндышев А.О., 2001; Хрулева Т.С., 2001; Тунгусова О.С. и соавт., 2005]. Возникновение таких мутации отмечают также у природных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, однако вероятность их появления невысокая и составляет для изониазида - 10^{-6} , для рифампицина - 10^{-8} , а одновременно для изониазида и рифампицина - 10^{-10} [Starke J.R., Heifets L., 1997].

Независимо от чувствительности/устойчивости МБТ к противотуберкулезным препаратам ТЛ принято разделять на первичный и вторичный. Для первичного ТЛ, являющегося результатом первоначального инфицирования макроорганизма МБТ, возникающего чаще в детском и подростковом возрасте, характерно формирование ограниченного участка воспаления в ткани легкого, воспаление лимфатических сосудов; увеличение лимфатических узлов средостения, в которых завершается

путь инфекции [Перельман М.И., 1997, 2001; Блум Б.Р., 2002; Еремеев В.В., 2004]. На высоте гранулематозной реакции в очаге преобладают Т-лимфоциты, присутствуют В-лимфоциты, макрофаги и другие клеточные элементы, в том числе эозинофильные гранулоциты [Lasco T.M. et al., 2004; Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009; Nattori Y. et al., 2011]. Макрофаги постепенно трансформируются в гигантские эпителиоидные клетки Пирогова-Лангханса, которые осуществляют эффекторную функцию. В центре гранулемы может появляться небольшой участок казеозного некроза. При разрешении первичного аффекта зона поврежденной легочной ткани пропитывается солями кальция с последующим формированием, так называемых, очагов Гона [Апт А.В., Кондратьева Т.К., 2008; Струков А.И., Серов В.В., 2010; Welin A., Lerm M., 2012]. По данным ряда авторов, для первичного ТЛ характерно развитие эозинофильной реакции крови [Перельман М.И., 2001; Блум Б.Р., 2002; Мишин В.Ю. и соавт., 2002].

Вторичный ТЛ представляет собой результат реинфекции или реактивации эндогенной инфекции с формированием процесса на «иммунных памятниках» первичного инфицирования [Перельман М.И., 2007; Филинук О.В., 2011]. Болезни подвержено преимущественно взрослое население [Струков А.И., Серов В.В., 2010; Корецкая Н.М., 2011]. Вторичный ТЛ включает восемь клинико-морфологических форм, наиболее распространенными среди которых являются инфильтративный и диссеминированный ТЛ.

Инфильтративный туберкулез легких (ИТЛ) составляет 60 - 70 % среди впервые выявленных больных; характеризуется экссудативным типом воспаления со склонностью к быстрому образованию казеозного некроза и деструкции [Хоменко А.Г., 1997; Казак Т.И., 2003]. ИТЛ может быть результатом суперинфекции, а также следствием реактивации имеющихся «старых» туберкулезных очагов в ткани легких [Перельман М.И., 2001; Блум Б.Р., 2002]. Особенностью данного варианта туберкулеза является формирование инфильтрата в месте внедрения МБТ или первичного аффекта. При ослаблении реакций местного иммунитета отмечается рост микробной популяции и гиперэргическая реакция легочной ткани, что обуславливает резко выраженную экссудацию без

признаков специфического воспаления с малым клеточным составом перифокального воспаления [Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007; Блум Б.Р., 2002].

Для диссеминированного туберкулеза легких (ДТЛ) характерно формирование множественных туберкулезных очагов в легочной ткани. Обязательными условиями для развития ДТЛ являются бактериемия (присутствие МБТ в крови), гематогенный и лимфогенный пути диссеминации возбудителя [Перельман М.И., 2007; Филинюк О.В., 2011]. Основным источником распространения *M. tuberculosis* при диссеминированном варианте ТЛ служат очаги Гона - остаточные очаги инфекции респираторной ткани. Дополнительная сенсibilизация макроорганизма (хронические неспецифические болезни дыхательной системы, инфекционные заболевания, нейроэндокринные расстройства) опосредует снижение общей реактивности организма и угнетение локальных иммунных процессов, что, в свою очередь, приводит к реактивации первичных инфекционных очагов [Левашов Ю.Н., Репин Ю.М., 2008]. Из остаточных очагов с током лимфы МБТ заносятся в сосуды большого круга и далее с кровью по сосудам малого круга кровообращения рассеиваются в ткани легкого, обсеменяя паренхиму [Филинюк О.В., 2011]. Распространенность очагов и характер протекания воспаления при ДТЛ обусловлены индивидуальной реактивностью макроорганизма, массивностью и длительностью бактериемии, а также выраженностью вторичной иммунологической недостаточности.

Инфильтративный и диссеминированный варианты ТЛ различаются не только особенностями патогенеза, существенное отличие зарегистрировано в механизмах протекания иммунного ответа на МБТ. Так, ИТЛ характеризуется высоким пролиферативным ответом лимфоцитов с сохранением резерва функциональной активности мононуклеарных лейкоцитов крови секретировать провоспалительные медиаторы [Аверченков В.М. и соавт., 1998; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Kuz'mina I.K., Gubkina M.F., 2009; Уразова О.И. и соавт., 2010]. Для диссеминированного варианта туберкулезной инфекции характерно, напротив, снижение функциональной активности Т-лимфоцитов, моноцитов и полиморфноядерных гранулоцитов, при этом регистрируется усиленная дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки, секретирующие

иммуноглобулины [Howard J., Zwilling S., 1999; Аутеншлюс А.И. и соавт., 2004; Чепель Э. и соавт., 2008; Воронкова О.В. и соавт., 2010].

Таким образом, в зависимости от характера течения туберкулезного процесса выделяют различные формы специфического иммунного ответа. Для ИТЛ, как правило, характерен клеточный Th1-зависимый иммунный ответ, в случае же ДТЛ преобладают Th2-опосредованные иммунные реакции.

1.1.2. Иммунопатогенез туберкулеза легких: дизрегуляторные взаимодействия клеток врожденного и адаптивного иммунитета

В основе формирования защитных реакций макроорганизма на *M. tuberculosis* лежит эффективное функционирование Т-клеточного звена иммунного ответа, ключевыми клетками которого являются CD4⁺ Т-лимфоциты-хелперы (Th) типа 1 [Воробьев А.А. и соавт., 2006; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Симбирцев А.С., 2011]. Механизм эффекторного действия Th1-лимфоцитов заключается в секреции цитокинов, привлекающих в очаг воспалительной реакции дополнительные «порции» клеток с последующим образованием гранулемы.

Индукция противотуберкулезного иммунного ответа начинается со связывания экспрессированных на антигенпрезентирующих клетках (АПК - дендритных клетках, моноцитах/макрофагах) Toll-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLR) с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PAMP - pathogen associated molecular patterns) *M. tuberculosis* (липоарабиноманнан клеточной стенки) [Симбирцев А.С., 2005; Хаитов Р.М. и соавт., 2009; Фрейдлин И.С., 2011; Хаитова З.К. и соавт., 2012]. Следующая за этим активация TLR2 и TLR4 на дендритных клетках и макрофагах приводит (через систему адаптерных молекул и транскрипционных факторов) к индукции секреции провоспалительных цитокинов (IL (interleukin) 12, IL-1, IL-6, IL-18) и экспрессии на АПК молекул костимуляции (CD80, CD86) и главного комплекса гистосовместимости (HLA – human leukocyte antigen) II класса [Пащенко М.В., Пинегин Б.В., 2006; Авдеев М.Г. и соавт., 2007]. В результате формируются все необходимые условия (цитокиновый фон, рецепторное микроокружение) для взаимодействия АПК с Т-клетками с последующим формированием соответствующих Th-клонов лимфоцитов

[Srivastava V. et al., 2009; Cavalcanti Y.V. et al., 2012].

Наряду с макрофагами и дендритными клетками, в распознавании патогена могут участвовать и другие клетки врожденного иммунитета [Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2011; Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2012]. Например, согласно данным литературы, широкий спектр петтерн-распознающих рецепторов (TLR, NKRs/iNKRs, NKG2D), представленных на мембране $\gamma\delta$ T-клеток, позволяет им также определять антигены небелковой природы [Uhlig H.H., Powrie F., 2005]. При непосредственном контакте и за счет секреции цитокинов $\gamma\delta$ T-лимфоциты вовлекают АПК в специфический иммунный ответ, направленный на сдерживание размножения возбудителя. По мнению ряда авторов, данный механизм предотвращает развитие болезни у человека при первичном инфицировании [Бородулин Б.Е., 2003; Левашова Т.В., 2008; Нижегородова Д.Б., Зафранская М.М., 2009; Павлов В.А. и соавт., 2011; Фрейдлин И.С., 2011]. Участие $\gamma\delta$ T-клеток в реакциях противoinфекционной резистентности продемонстрировано экспериментальными исследованиями *in vitro* и *in vivo*. Многие микроорганизмы, имеющие в составе клеточной стенки фосфоантигены, способны инициировать процессы клональной экспансии $V\gamma9V\delta2^+$ T-клеток, количество которых в отдельных случаях может достигать 90 % (от общего числа T-лимфоцитов периферической крови). Имеются экспериментальные доказательства вовлечения циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток в механизмы элиминации *M. tuberculosis* [Mincheva-Nilsson L., 2003; Левашова Т.В., 2007; Нижегородова Д.Б., Зафранская Н.М., 2009; Чурина Е.Г. и соавт., 2012].

В распознавании небелковых антигенов на доиммунном этапе воспалительного ответа наряду с $\gamma\delta$ T-лимфоцитами способны участвовать и другие клетки врожденного иммунитета - эозинофильные гранулоциты - клетки, ранее не изученные в контексте не только ТЛ, но и бактериальной инфекции в целом. По данным J. Kirman et al. [2009] и F. Legrand et al. [2009], за счет экспрессии TLR2 и $\gamma\delta$ TCR (T-cell receptor) на мембране эозинофилов возможно распознавание

антигенов *M. tuberculosis* с последующим высвобождением иммунорегуляторных цитокинов.

Наряду с антигенраспознающей функцией, у $\gamma\delta$ Т-клеток и эозинофильных гранулоцитов показана способность выступать в качестве профессиональных АПК, участвующих в праймировании наивных $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Нижегородова Д.Б., Зафранская Н.М., 2009; Hogan S.P. et al., 2008; Park Y.M. et al., 2010; Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2012]. Возможность временной экспрессии CCR7 обеспечивает миграцию активированных $\gamma\delta$ Т-клеток в лимфатические узлы, где большинство Т-лимфоцитов контактирует с антигеном. По сведениям J. Kirman et al. [2009], эозинофилы способны осуществлять эффективное поглощение бактериальных агентов с последующим их процессингом и презентацией антигенных детерминант иммунокомпетентным клеткам в комплексе с представленными на эозинофилах молекулами типа HLA II.

Уникальной особенностью $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и эозинофильных гранулоцитов является то, что они комбинируют в себе свойства клеток врожденного и приобретенного иммунного ответа, осуществляя иммунорегуляторные функции. Показано, что активированные $\gamma\delta$ Т-клетки в значительных количествах секретируют IFN (interferon) γ . Наряду с этим, $\gamma\delta$ Т-лимфоциты способны нарабатывать противовоспалительные цитокины и медиаторы с иммуносупрессорной активностью (IL-4, IL-10, TGF (transforming growth factor) β) [Hayday A., 2000; Bonneville M., Fournie J., 2005]. A. Hayday, R. Tigelaar (2003) показали, что резидентные Т-клетки с гамма-дельта-TCR синтезируют IL-16, регулирующий функциональную активность Th2-лимфоцитов и созревание дендритных клеток, а также IL-17B, который активирует высвобождение IL-6 и IL-8 хелперными клонами Т-клеток [Bonneville M., 2006].

Эозинофильные гранулоциты секретируют свыше 30 цитокинов с протективным действием в отношении туберкулезной инфекции (IL-2, IL-12, IFN γ и TNF (tumor necrosis factor) α), а также являются источником противовоспалительных (IL-4, IL-5 и IL-13) и иммуносупрессорных (IL-10 и TGF β)

медиаторов [Levi-Schaffer F. et al., 2000; Lacy P., Moqbel R., 2000; Hogan S.P. et al., 2008]. Дисбаланс цитокинов, секретируемых клетками врожденного иммунитета, программирует направленность иммунного ответа по пути доминирования отдельных субпопуляций Th-лимфоцитов (Th1, Th2, Th9, Th17 или Treg), опосредуя формирование неэффективного адаптивного иммунного ответа на МБТ.

В свою очередь, истинными регуляторами иммунного ответа являются Т-лимфоциты-хелперы, среди которых выделяют особую субпопуляцию регуляторных Т-клеток (Treg). Посредством конкурентного захвата и секвестрации IL-2, CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4)/CD86-опосредованного разобщения сигналов костимуляции, секреции ингибирующих цитокинов (преимущественно TGF β и IL-10), а также индукции перфорин-гранзимового апоптоза эти клетки способны супрессировать пролиферацию различных клонов Т-лимфоцитов адаптивного иммунитета с формированием Т-клеточной анергии [Ярилин А.А., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2011; Miyaga M., Sakaguchi S., 2011]. Недавними исследованиями установлен также факт негативного влияния Treg на реализацию механизмов врожденного иммунитета. При непосредственном контакте с клетками «первой линии защиты» за счет конкурентного связывания CTLA-4 с молекулами костимуляции B7 и секреции TGF β и IL-10 Treg ингибируют функциональную активность макрофагов, дендритных клеток, $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов и NK (natural killer), блокируют процесс рекрутирования полиморфноядерных лейкоцитов в очаг воспаления, угнетают их цитокинсекреторную и бактерицидную функции [Сахно Л.В. и соавт., 2004; Фрейдлин И.С., 2011].

На сегодняшний день классифицированы две субпопуляции Treg – естественные тимические Treg-лимфоциты с иммунофенотипом T_{nr} и индуцированные на периферии T_{ir}, среди которых в зависимости от спектра секретируемых медиаторов выделяют Th3 и Tg1. По мнению ряда исследователей, избыточная активность регуляторных Т-клеток обуславливает снижение интенсивности протективного иммунного ответа в борьбе макроорганизма с *M. tuberculosis* [Chen X. et al., 2003; Lee D.C. et al., 2010]. Е.Г. Чуриной и соавт. [2011] показано, что ведущую роль в формировании иммуносупрессии при ИТЛ и ДТЛ, а также фиброзно-кавернозном ТЛ играют CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-лимфоциты,

содержание которых оказалось повышенным как при лекарственно-чувствительном, так и при лекарственно-резистентном вариантах заболевания.

Как уже упоминалось, основное значение в реакциях противотуберкулезной резистентности отводится CD4⁺ Т-лимфоцитам [Boom W.H et al., 1991; Салина Т.Ю., Худзик Л.Б., 2001; Gao G.F. et al., 2002; Фрейдлин И.С., 2011]. Функциональная активность последних в процессе распознавания антигенных детерминант МБТ обуславливает направленность иммунного ответа с превалированием клеточных реакций или выработки иммуноглобулинов. В то же время дифференцировка Th0-лимфоцитов в направлении отдельных их субпопуляций зависит от структуры антигена; от стабильности связей иммунологического синапса между лимфоцитами и АПК; цитокинового спектра *in situ* и др. [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Шпаковская Н.С. и соавт., 2007; Ярилин А.А., 2010].

Доминирование определенных субпопуляций хелперных клонов лимфоцитов может приводить к избирательному развитию иммунного ответа определенного типа, обозначаемому термином «иммунное отклонение». Среди широкого разнообразия факторов, обуславливающих «иммунное отклонение», основная роль отводится цитокинам [Аверченков В.М. и соавт., 1998; Шпаковская Н.С. и соавт., 2007; Симбирцев А.С., 2011; Чурина Е.Г., 2012].

Ключевым фактором, детерминирующим дифференцировку Th0-лимфоцитов в направлении Th1, считается IL-12, протективные эффекты которого, опосредованные IFN γ -зависимыми механизмами, проявляются усилением продукции оксида азота, увеличением экспрессии адгезивных молекул и продукции хемокинов, активацией цитотоксической активности НК-клеток и цитотоксических CD8⁺ лимфоцитов [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001; Воронкова О.В. и соавт., 2007]. IL-12 является значимым фактором в реализации эффекторных механизмов развития иммунного ответа при ТЛ. Установлено, что гиперсекреция IL-12 обуславливает сдвиг иммунитета в направлении клеточно-опосредованных реакций и инициирует хронизацию воспалительного процесса [Фрейдлин И.С., 2008]. Дефицит продукции данного цитокина может обуславливать повышенную восприимчивость макроорганизма к заражению МБТ

[Wang G. et al., 1999].

Другим индуцибельным медиатором, продуцируемым преимущественно Th1-лимфоцитами, является IL-2 - основной аутокринный фактор роста лимфоцитов [Симбирцев А.С., 2011]. IL-2 стимулирует процессы пролиферации и дифференцировки Т-клеток и естественных киллеров, усиливает экспрессию комплементарных рецепторов на Т- и В-лимфоцитах, продукцию самого себя и других провоспалительных цитокинов, повышает цитотоксичность макрофагов и NK-клеток, инициирует секрецию плазматическими клетками иммуноглобулинов [Kintzel P.E., Calis K.A., 1991; Zhang M., 1995; Granucci F. et al., 2001; Сахно Л.В. и соавт., 2006]. Особый интерес представляет, на наш взгляд, способность IL-2 активировать пролиферацию одновременно Th1-лимфоцитов и регуляторных Т-клеток с супрессорной активностью [Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2011]. Такой дуализм свойств медиатора, с одной стороны, может способствовать реализации эффективного клеточно-зависимого иммунного ответа на *M. tuberculosis*, а с другой - вызывать иммуносупрессию и хронизацию инфекционного процесса.

Самым мощным модулятором иммунного ответа, способным направлять дифференцировку Th0 в Th1, является IFN γ [Кашкин К.П., 1998; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2004]. Последний обладает плюрипотентной биологической активностью: является основным индуктором макрофагов и дендритных клеток, усиливающим их фагоцитарные и микробицидные свойства; фактором активации NK-клеток, осуществляющих лизис инфицированных клеток-мишеней; активатором антигенпрезентирующей функции клеток иммунной системы [Сахарова И.Я., 2005; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2010; Cavalcanti Y.V. et al., 2012]. IFN γ считается ведущим фактором, обуславливающим формирование гранулемы в легочной ткани за счет активации процессов рекрутирования иммунокомпетентных клеток в очаг воспаления [Хаитов Р.М., 2009; Ярилин А.А., 2010]. Согласно современным данным, IFN γ рассматривается в качестве обязательного компонента эффективного протекания защитных реакций макроорганизма при ТЛ [Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2011]. Высокий уровень базальной и митоген-стимулированной продукции IFN γ лимфоцитами крови обуславливает благоприятное протекание туберкулезного

процесса. В свою очередь, дефицит секреции $IFN\gamma$ может приводить к нарушению способности макроорганизма подавлять рост и размножение внутриклеточных *M. tuberculosis* с последующим развитием осложнений и неблагоприятного исхода болезни [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008].

Еще одним фактором, участвующим в регуляции механизмов антибактериальной резистентности макроорганизма, является $TNF\alpha$, который оказывает разностороннее активирующее влияние на процессы миграции, адгезии, фагоцитоза и дегрануляции клеток-эффекторов воспаления [Herbein H., Brien W.A., 2000; Temkin V., Levi-Schaffer F., 2001]. $TNF\alpha$ стимулирует механизмы внутриклеточного киллинга МБТ путем генерации активных форм кислорода и оксида азота. Данный цитокин считается маркером активации туберкулезного воспаления, выполняет ключевую роль в формировании туберкулезной гранулемы [Гергерт В.Я. и соавт., 1995; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Cavalcanti Y.V. et al., 2012]. В эксперименте показано, что при введении мышам ингибитора $TNF\alpha$ у животных снижался гранулематозный ответ на инвазию, туберкулезный процесс прогрессировал и животные погибали [Mohan P.V. et al., 2001]. У человека уровень секреции $TNF\alpha$ напрямую зависит от морфологического варианта ТЛ и выраженности клинических проявлений заболевания (лихорадки и кахексии) [Филинюк О.В., 2011].

Антагонистические свойства (по отношению к Th1-лимфоцитам) в реализации механизмов противотуберкулезной защиты проявляют противовоспалительные медиаторы (IL-4, IL-5, IL-6 и др.), опосредующие развитие гуморального иммунитета, и цитокины с иммуносупрессорной активностью (IL-10 и TGF β) [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001; Хаитов Р.М., 2009; Ярилин А.А., 2010; Симбирцев А.С., 2011]. Известно, что IL-4 регулирует баланс механизмов активации и супрессии иммунного ответа за счет способности стимулировать дифференцировку моноцитов и при этом подавлять $IFN\gamma$ -опосредованную активность тканевых макрофагов [McCoу M.E. et al., 2010]. Биологическая роль IL-4 заключается также в усилении функциональной активности В-лимфоцитов при одновременном угнетении IL-2-зависимой пролиферации Т-клеток и цитотоксичности НК [Кетлинский С.А., Симбирцев А. С., 2008; Ярилин А.А., 2010;

Соботюк Н.В. и соавт., 2011].

Другим фактором, активирующим Th2-звено иммунного ответа, в частности пролиферативную и иммуноглобулинсекретирующую функции В-лимфоцитов, является IL-6. Роль последнего в регуляции иммунного ответа двойственна: с одной стороны, IL-6 проявляет синергизм с IL-1, IL-8 и TNF α , однако как фактор, активирующий В-лимфоциты, выполняет противовоспалительную функцию. С другой стороны, IL-6 способен ингибировать образование IL-1 и TNF α , супрессировать активирующее влияние IFN γ и TNF α на клетки-мишени, блокировать микробицидную активность макрофагов [Симбирцев А.С., 2004]. Согласно данным R.S. Wallis et al. [1994], *M. tuberculosis* способны сами индуцировать секрецию IL-6 макрофагами, что подавляет синтез Т-лимфоцитами макрофаг-активирующих цитокинов и облегчает дальнейшую персистенцию внутриклеточных патогенов.

К противовоспалительным медиаторам относят также IL-10 - цитокин с выраженными иммуносупрессорными свойствами. Основными клетками-продуцентами IL-10 являются CD4⁺ Т-лимфоциты-хелперы, CD8⁺ цитотоксические лимфоциты, активированные В-лимфоциты и регуляторные Т-клетки. Известно, что IL-10 способен регулировать Th1/Th2-баланс путем снижения синтеза IL-2 и IFN γ и индукции функции Treg. IL-10 ингибирует также экспрессию молекул костимуляции CD80/CD86 АПК, нарушая процесс презентации антигена Th1-лимфоцитам [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Redford P.S. et al., 2011; Remoli M.E. et al., 2011; Pitt J.M. et al., 2012]. Многие исследователи рассматривают IL-10 в качестве универсального супрессорного цитокина [Ярилин А.А., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2011; Miyara M., Sakaguchi S., 2011].

Роль негативного регулятора в иммунном ответе, ограничивающего развитие гиперергических реакций, играет также TGF β , основным источником которого являются регуляторные Т-клетки типа Tr1 и Th3 [Ярилин А.А. и соавт., 2010; Чурина Е.Г. и соавт., 2011]. Данный цитокин продуцируется многими клетками, в том числе фибробластами, хондроцитами, остеобластами, макрофагами, эозинофилами и др. Ключевая роль TGF β заключается в формировании иммуносупрессии и реализации противовоспалительных эффектов, включая

снижение секреции иммунокомпетентными клетками цитокинов и цитотоксических факторов. В результате блокируются механизмы адаптивного иммунного ответа, обеспечивается толерантность к веществам антигенной природы. Индуцированный микобактериальными антигенами TGF β в комплексе с IL-10 способен вызывать стойкое состояние анергии антигенспецифических CD4⁺ Т-клеток и нейтрофилов, однако механизм такого влияния изучен недостаточно [Pace L. et al., 2005; Cavalcanti Y.V. et al., 2012].

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что слаженное функционирование цитокиноопосредованных механизмов клеточного и гуморального иммунного ответа, инициированного МБТ, сбалансированное функционирование механизмов иммуносупрессии направлено на ограничение воспалительного очага в месте локализации инфектогена с последующим формированием специфической туберкулезной гранулемы. В клеточный состав гранулемы входят различные клеточные элементы: макрофаги (преобладают), трансформирующиеся в гигантские эпителиоидные клетки Пирогова-Лангханса, Т- и В-лимфоциты, нейтрофилы, фибробласты и др. [Вахидова Г.А. и соавт., 1991; Маянский А.Н., 2001; Перельман М.И., 2001; Блум Б.Р., 2002; Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007; Авербах М.М., 2010; Павлов В.А. и соавт., 2011; Welin A., Lern M., 2012]. В последние годы зарубежными исследователями доказано присутствие в гранулеме эозинофильных гранулоцитов [Lasco T.M. et al., 2004; Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009; Hattori Y. et al., 2011]. Хотя многие отечественные исследователи ставят под сомнение участие эозинофилов в развитии туберкулеза, ассоциированного с активацией преимущественно клеточного звена иммунитета, в последнее время произошло значительное переосмысление представлений о функциональном потенциале эозинофильных гранулоцитов. Это позволяет рассматривать эозинофилы в качестве полноценных участников врожденного и адаптивного иммунного ответа на МБТ.

1.2. Современный взгляд на кинетику, структуру и функции эозинофильных гранулоцитов

Эозинофилы – полиморфноядерные лейкоциты, впервые обнаруженные в 1846 г. английским анатомом T.W. Jones, а затем повторно открытые в 1879 г. P. Ehrlich, который впервые использовал для этих клеток кислый краситель эозин, названный в честь богини утренней зари Эос [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Hogan S.P. et al., 2008; Park Y.M., Bochner B.S., 2010].

Процессы пролиферации и дифференцировки лейкоцитов эозинофильного ряда (эозинофилопоэз) осуществляются исключительно в костном мозге. Эозинофилы происходят из плюрипотентной стволовой кроветворной клетки, дальнейшее развитие которой в клетку-предшественницу эозинофильных гранулоцитов обусловлено взаимодействием трех классов транскрипционных факторов, включая GATA-1 (zinc finger family member), PU.1 (Ets family member), а также белки семейства с/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein family) [Hirasawa R. et al., 2002; McNagny K.M., Graf T., 2002; Yu C. et al., 2002; Uhm T.G. et al., 2012; Wong W., Jelinek D.F., 2013]. Изолировано все эти три фактора транскрипции экспрессируются в клетках различных гемопозитических линий, однако синергизм их воздействия определяет развитие гранулоцитов исключительно эозинофильной линии. Примечательно, что последующая экспрессия гранулярных белков эозинофилов регулируется также с/EBP α и PU.1 [Du J. et al., 2002]. Наряду с указанными транскрипционными факторами, особо важное значение в регуляции эозинофилопоэза имеют IL-3, IL-5 и GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), которые кодируются тесно сцепленными генами, расположенными на 5q31 хромосоме и реализуют свои свойства посредством связывания со специфическими рецепторами, имеющими общую β -субъединицу и уникальные α -цепи [Lacy P., Moqbel R., 2000; Leeuwen Van H.B. et al., 2003; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. IL-5 является ключевым медиатором, обеспечивающим финальные стадии созревания эозинофильных гранулоцитов и их последующий выход в кровеносное русло, где они циркулируют от 6 до 18 ч [Mishra A. et al., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Wong W., Jelinek D.F., 2013]. Затем под влиянием хематрактантов, в частности эотаксина-1,

эозинофилы мигрируют в ткани, главным образом, в желудочно-кишечный тракт, где они пребывают в пределах lamina propria всех сегментов, кроме пищевода [Gouon-Evans V., Pollard J.W., 2001]. Эозинофилы желудочно-кишечного тракта являются преобладающей популяцией тканевых лейкоцитов эозинофильного ряда. Вместе с тем, гемические эозинофилы заселяются в легкие, тимус, кожу, молочные железы и матку, при этом транспорт клеток в матку регулируется эстрогенами и зависит от фазы менструального цикла [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Leeuwen Van H.B et al., 2003; Hogan S.P. et al., 2008]. Переселение эозинофилов в вилочковую железу происходит в неонатальном периоде, достигая максимального уровня к двухнедельному возрасту. По сведениям M. Throsby et al. [2000], абсолютное число эозинофилов в тимусе эквивалентно содержанию тимических дендритных клеток. Эозинофилы тимуса инициируют апоптоз тимоцитов через экспрессию костимулирующих молекул, вовлеченных в клональную делецию, и продукцию активных форм кислорода.

Период жизни эозинофильных гранулоцитов в тканях (в среднем 5-10 дней) зависит от локального влияния биологически-активных веществ (IL-4, IL-5, GM-CSF, простагландина E₂, PAF (platelet activated factor) и др.), выделяемых элементами микроокружения и самими эозинофилами [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Mishra A. et al., 1999; Воробьев А.И., 2003; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009].

В норме относительное содержание эозинофильных гранулоцитов в периферической крови составляет 1 - 5 % от общей популяции лейкоцитов, что в абсолютных единицах соответствует $(0,07 - 0,350) \times 10^9 / \text{л}$. На каждый циркулирующий в крови эозинофил приходится около 300 клеток (зрелых и незрелых) в костном мозге и от 100 до 300 эозинофильных лейкоцитов в тканях [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Wong W., Jelinek D.F., 2013]. Продолжительность жизни зрелых эозинофилов составляет от 3 - 6 ч до 3 - 6 суток (в среднем 48 ч), после чего клетки

подвергаются апоптозу в циркуляции и паренхиматозных органах (селезенка, печень, легкие) [Park Y.M., Vochner B.S., 2010].

Морфологически лейкоциты эозинофильного ряда представляют собой гранулярные клетки, включающие эксцентрично расположенное ядро с частично конденсированным хроматином и остатками ядрышек. Ядро эозинофила представлено малым количеством сегментов (как правило, двумя), однако при гиперэозинофилиях количество ядерных долек может достигать пяти и более [Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009]. Отличительной особенностью эозинофилов является наличие в цитоплазме крупных гранул, содержащих специфические белки, которые обуславливают их оксифильную окраску.

1.2.1. Гранулярный аппарат эозинофильных лейкоцитов

Эозинофилы содержат четыре типа секреторных гранул: кристаллические гранулы, первичные гранулы, малые гранулы, а также секреторные пузырьки. Самые крупные из секреторных органелл кристаллические (вторичные или специфические) гранулы (0,5-0,8 мкм в диаметре), формирующиеся на стадии миелоцита из больших первичных сферических лизосомальных структур, представлены мембраной, сильно окрашенным электронно-плотным кристаллическим ядром, окруженным электронно-прозрачным матриксом. Специфические гранулы эозинофилов содержат основные эозинофильные протеины (главный щелочной протеин, эозинофильный катионный протеин, эозинофильную пероксидазу и эозинофильный нейротоксин), ферменты (коллагеназу, эластазу, β -глюкоронидазу, катепсины, РНКазу, миелопероксидазу) и цитокины (IL-2, IL-5, IL-4, GM-CSF и др.) [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Hogan S.P. et al., 2008; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Josiane S. et al., 2009]. Главный щелочной протеин занимает большую часть кристаллического ядра специфических гранул, тогда как остальные белки локализуются в некристаллическом матриксе [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. В процессе гемопоэза первичные гранулы в клетках эозинофильного ряда

появляются на стадии промиелоцита, они содержат лизофосфатазу, которая подвергается кристаллизации с образованием особых кристаллов Шарко-Лейдена [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999]. В цитоплазме эозинофильных лейкоцитов обнаруживаются также малые гранулы, включающие пероксидазу, кислую фосфатазу, арилсульфатазу В и др.; липидные тельца (около 5 на клетку), депонирующие все необходимое для синтеза эйкозаноидов: арахидоновую кислоту, липоксигеназу и циклоксигеназу [Dvorak A.M., Weller P.F., 2000]. Некоторые авторы указывают на присутствие в цитоплазме эозинофилов L-гранул, содержащих гистамин, различные микроэлементы, некоторые ферменты (антигиалуронидазу, оксидазы) и др. [Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003].

Основным компонентом специфических гранул эозинофилов является главный щелочной (или основной) протеин (MBP - major basic protein) - белок с молекулярной массой 13,8 кДа, который экспрессируется в виде двух разных гомологов (MBP1 и MBP2). Данный белок проявляет тропность к анилиновым красителям, что позволяет идентифицировать специфические гранулы эозинофильных клеток (гранулы окрашиваются в оранжево-розовый цвет) [Hamann K.J. et al., 1991]. Эозинофильные гранулоциты содержат значительные количества главного щелочного белка. В эозинофилах морских свинок его содержание составляет примерно 250 пг на клетку, в эозинофилах человека - 5-10 пг на клетку [Porphen-Harris P. et al., 1998]. MBP1 обнаруживается также в гранулах базофилов, хотя и в меньших количествах. Следует отметить, что весь MBP, который депонируется в кристаллических гранулах эозинофилов, синтезируется на ранних стадиях эозинофилопоэза. Зрелые эозинофилы утрачивают способность воспроизводить mRNA, кодирующую главный щелочной белок [Plager D.A. et al., 2006]. Сравнительно недавно установлен факт возрастания концентрации MBP в сыворотке крови у беременных женщин (с пиком за 2-3 недели до родов) за счет, преимущественно, MBP1, который, по мнению исследователей, синтезируется клетками плаценты [Maddox D.E. et al., 2010]. В свою очередь, MBP2 экспрессируется исключительно эозинофилами и является более специфическим

маркером (чем МВР1) высокого содержания эозинофилов у пациентов с эозинофилией [Plager D.A. et al., 2006].

Противопаразитарная функция эозинофилов опосредуется токсическим влиянием именно МВР. В последние годы особое внимание обращают на токсический эффект данного белка в отношении бактерий [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. Кроме этого, данный протеин оказывает повреждающее действие на клетки дыхательных путей в случае эозинофильной инфильтрации слизистой бронхов у больных бронхиальной астмой [Furuta G.T. et al., 2005]. Цитотоксический эффект МВР реализуется за счет изменения поверхностного заряда клетки, что приводит к возмущению липидного бислоя мембраны и повышению ее проницаемости [Hamann K.J. et al., 1991; Hogan S.P., Rosenberg H.F., 2008].

Свои функции главный щелочной протеин реализует совместно с другими белками гранул – эозинофильным катионным протеином и эозинофильной пероксидазой, которые обладают также высокой цитотоксичностью.

Эозинофильный катионный протеин (ЕСР - eosinophil cationic protein) - член подсемейства рибонуклеазы А, кодируемый несколькими генами, экспрессированными в эозинофилах (содержание ЕСР - 15-25 пг на клетку). Аналогично главному щелочному протеину, ЕСР является катионным полипептидом (молекулярная масса 16-21,4 кДа), аминокислотная последовательность которого имеет 66% гомологии с эозинофильным нейротоксином и 31% - с рибонуклеазой поджелудочной железы [Воробьев А.И., 2003; Hogan S.P. et al., 2008]. Методом гепарин-сефарозной хроматографии идентифицированы две изоформы данного белка: ЕСР-1 и ЕСР-2 [Gleich G.J. et al., 1986]. Установлено, что эозинофильный катионный протеин обладает бактерицидными свойствами, участвует в противовирусной защите, а также проявляет высокую токсичность по отношению к инфектогенам паразитарного происхождения (в 8-10 раз более активен, чем МВР) [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999]. Механизм токсического действия ЕСР связан с образованием пор в мембране клеток-мишеней и не зависит от его рибонуклеазной активности [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. ЕСР индуцирует также высвобождение

гистамина из базофилов и тучных клеток, поддерживая тем самым развитие воспаления; блокирует пролиферацию отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов, вмешиваясь в регуляцию адаптивных клеточно-опосредованных реакций [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Blom K. et al., 2012].

Еще один белок эозинофилов - эозинофильный нейротоксин (EDN - eosinophil-derived neurotoxin), обозначаемый также как эозинофильный белок X (EPX - eosinophil protein X), представляет собой полипептид с молекулярной массой 18,6 кДа, характеризующийся меньшей основностью (чем MBP и ECP) за счет сниженного числа остатков аргинина в его последовательности [Воробьев А.И., 2003; Hogan S.P. et al., 2008]. Эозинофильный нейротоксин, подобно ECP, является членом семейства рибонуклеазы А, его экспрессия обнаруживается также в мононуклеарных лейкоцитах и нейтрофилах [Domachowske J.V. et al., 1998]. Свое название эозинофильный нейротоксин получил из-за тех изменений неврологического характера, которые он инициировал в эксперименте. При инъекции эозинофильного нейротоксина в спинномозговой канал и желудочки мозга морских свинок или кроликов регистрировалось поражение мозжечка, моста и спинного мозга (феномен Гордона) [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Schleich F.N. et al., 2013]. Установлено, что эозинофильный нейротоксин вызывает гиперреактивность бронхов за счет изменения характера иннервации мышц бронхиального дерева [Анаев Э.Х., 2002; Eltboli O., Brightling C.E., 2013]. EDN обладает также противовирусной активностью, что было продемонстрировано в эксперименте у животных, инфицированных респираторным синцитиальным вирусом [Domachowske J.V. et al., 1998].

Эозинофильная пероксидаза (ЕРО - eosinophil peroxidase), состоящая из двух субъединиц: тяжелой (50-57 кДа) и легкой (11-15 кДа), потенцирует цитотоксичность лизосомальных катионных белков [Hogan S.P. et al., 2008]. ЕРО имеет 68% гомологии с миелопероксидазой нейтрофилов. При участии перекиси водорода (генерируемой вследствие дисмутации супероксид-аниона), галогенидов (бромиды, хлорида или иодида) и псевдогалогенидов (тиоционата),

присутствующих в плазме крови, ЕРО формирует потенциальную цитотоксическую систему, эффективную против бактерий, вирусов, гельминтов и опухолевых клеток [Wang J., Slungaard A., 2006]. В отличие от миелопероксидазы нейтрофилов ЕРО обладает способностью инициировать повреждение клеточной стенки патогена и в отсутствие перекиси водорода [Borelli V. et al., 1999, 2003]. Кроме этого, пероксидаза эозинофилов способствует дегрануляции тучных клеток, блокирует рецепторы фагоцитоза на нейтрофильных гранулоцитах, привлекает моноциты и макрофаги в очаг воспаления для более эффективной элиминации микроорганизмов [Henderson J.P. et al., 2001; Lacy P. et al., 2003].

Некоторые авторы указывают на способность эозинофильных лейкоцитов синтезировать и депонировать в специфических гранулах фактор, усиливающий цитотоксичность эозинофилов, - ECEF (eosinophil cytotoxicity enhancing factor), обнаруживаемый и в других клетках. Ключевая роль этого медиатора заключается в потенцировании биоцидности эозинофилов в отношении трансформированных клеток, антигенных детерминант гельминтов и др., посредством усиления адгезионных свойств клеток и их способности генерировать эйкозаноиды [Elsas P.X. et al., 1990; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Еще одним компонентом эозинофильных гранул является белок CLC (Charcot-Leyden crystal), известный еще как галектин-10, который, как полагали ранее, обладает слабой активностью лизофосфолипазы. На сегодняшний день известно, что CLC – это гидрофобный белок с молекулярной массой 17,4 кДа, который модулирует функциональную активность лизофосфолипазы эозинофилов и обладает сильной гомологией последовательности с белками семейства углеводсвязывающих галектинов, в связи с чем имеет также название «галектин-10». Его высвобождение приводит к образованию различных бесцветных иглообразных структур размером 20-40 мкм в длину и 2-4 мкм в поперечнике [Askerman S.J. et al., 2002]. Однако эта функция остается неясной.

Помимо вышеуказанных протеинов, гранулы эозинофилов включают широкий арсенал биологически активных веществ: кислую фосфатазу и арилсульфатазу В, которые осуществляют инактивацию медленно действующих субстанций анафилаксии и факторы хемотаксиса; фосфолипазу В и D,

нейтрализующие фактор активации тромбоцитов и снижающие способность этих клеток к дегрануляции; а также неспецифическую эстеразу и витамин В₁₂-связывающий белок [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. Присутствующая в малых гранулах эозинофилов гистаминаза регулирует уровень главного медиатора воспаления - гистамина путем его инактивации; простагландины (P_g) D₁ и D₂ взаимодействуют со специфическими рецепторами на мембране эозинофилов и потенцируют их хемотаксис; коллагеназа деструктивно воздействует на коллаген I и III типов [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. Эозинофильные гранулоциты человека являются также источником металлопротеиназ межклеточного матрикса, которые играют важную роль в процессах пролиферации, дифференцировки и миграции клеток, ремоделировании тканей, ангиогенезе, апоптозе и др. [Gauthier M.C. et al., 2003; Wiehler S. et al., 2004]. По данным I. Ohno et al. [1997], матриксная металлопротеиназа-9 локализуется в перинуклеарной зоне, а не в кристаллических гранулах эозинофилов.

Особого внимания заслуживает способность эозинофильных гранулоцитов продуцировать и депонировать в своих гранулах цитокины [Lacy P., Moqbel R., 1997, 2000; Woerly G. et al., 1999; Moqbel R., Coughlin J.J., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Speirs R.S. et al., 2009; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013]. Медиаторы, выделяемые эозинофилами, как правило, производятся в относительно небольших количествах, хотя в некоторых случаях эозинофилы являются основными продуцентами цитокинов (в частности, TGF β при заболеваниях, сопровождающихся эозинофилией) [Kay A.B. et al., 2004]. Основное отличие цитокинсекреторных свойств Т-лимфоцитов, являющихся главным источником цитокинов, и эозинофилов заключается в том, что эозинофильные лейкоциты способны депонировать некоторые факторы (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF α , GM-CSF, эотаксины, RANTES (regulated on activation normal T-cell expressed and secreted) и TGF α) в виде преформированных медиаторов в кристаллических гранулах и малых секреторных везикулах (табл. 1) [Lacy P., Moqbel R., 1997; Melo

R.C. et al., 2005, 2008; Spencer L.A. et al., 2009; Esnault S. et al., 2012]. Это позволяет немедленно высвободить необходимые количества медиатора при активации клетки, тогда как для синтеза цитокинов *de novo* требуется больший промежуток времени. Так, высвобождение RANTES происходит в течение 60-120 мин при стимуляции эозинофилов $IFN\gamma$, что обусловлено его быстрой мобилизацией (в течение 10 мин) из малых гранул, которые перемещают данный хемокин к клеточной мембране с целью его последующей экскреции [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006].

Таблица 1

Цитокины, продуцируемые эозинофильными гранулоцитами

Фактор	Продукты	Содержание белка в клетке (в состоянии покоя) (/10 ⁶ клеток)	Внутриклеточная локализация
1	2	3	4
Интерлейкины			
IL-1 α	мРНК, белок	-	-
IL-2	мРНК, белок	6 \pm 2 пг	Кристаллоидные гранулы (ядро)
IL-3	мРНК, белок	-	-
IL-4	мРНК, белок	\sim 75 \pm 20 пг	Кристаллоидные гранулы (ядро)
IL-5	мРНК, белок	-	Кристаллоидные гранулы (ядро/матрикс)
IL-6	мРНК, белок	25 \pm 6 пг	Кристаллоидные гранулы (матрикс)
IL-9	мРНК, белок	-	-
IL-10	мРНК, белок	25 пг	-
IL-11	мРНК, белок	-	-
IL-12	мРНК, белок	-	-
IL-13	мРНК, белок	-	-
IL-16	мРНК, белок	1,6 \pm 0,8 нг	-
IL-17	мРНК, белок	-	-
Интерферон и другие факторы			
IFN γ	мРНК, белок	-	-
TNF α	мРНК, белок	-	Кристаллоидные гранулы (матрикс)
GM-CSF	мРНК, белок	15,1 \pm 0,3 пг	Кристаллоидные гранулы (ядро)

Продолжение табл. 1

1	2	3	4
Хемокины			
ENA-78/CXCL5 (epithelial cell-derived neutrophil activating peptide)	мРНК, белок	12 ± 2 пг	-
Eotaxin-1 (CCL11)	мРНК, белок	19 ± 4 пг	Кристаллоидные гранулы
Growth-related oncogene (GRO α /CXCL1)	мРНК, белок	-	-
IL-8 (CXCL8)	мРНК, белок	140 пг	Цитоплазматический
IFN γ -inducible protein (IP-10/CXCL10)	мРНК, белок	-	-
IFN-inducible T-cell alpha chemoattractant (I-AC/CXCL11)	мРНК, белок	-	-
Macrophage inflammatory protein 1 α (MIP-1 α)	мРНК, белок	-	-
Monocyte chemoattractant protein1 (MCP-1/CCL3)	белок	-	-
Monokine induced by IFN γ (MIG/CXCL9)	мРНК, белок	-	-
MCP-3 (CCL7)	мРНК	-	-
MCP-4 (CCL13)	мРНК	-	-
RANTES (CCL5)	мРНК, белок	72 ± 15 пг	Кристаллоидные гранулы (матрикс) и малые секреторные везикулы

Продолжение табл. 1

1	2	3	4
Факторы роста			
Heparin-binding epidermal growth factor-like binding protein (HB-EGF-LBP)	мРНК	-	-
Nerve growth factor (фактор роста нервов)	мРНК, белок	4 ± 2 пг	-
Platelet-derived growth factor, B chain	мРНК	-	-
Stem cell factor	мРНК, белок	-	Мембрана, цитоплазма
TGF α	мРНК, белок	22 ± 6 пг	Кристаллоидные гранулы (матрикс) и малые секреторные везикулы
TGF β 1	мРНК, белок	-	-

Примечание: по данным S.P. Hogan et al. [2008]; C. Blanchard, M.E. Rothenberg [2009]; R.S. Speirs et al. [2009]; Y.M. Park, B.S. Bochner [2010]; S. Esnault et al. [2012]; P.C. Fulkerson, M.E. Rothenberg [2013]; S. Al-Muhsen et al. [2013]; S. Esnault et al. [2013]

Молекулярный механизм высвобождения депонированных цитокинов и других биологически активных веществ из гранул эозинофильных клеток опосредован экспрессией молекул SNARE (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) attachment receptor), представляющих собой группу белков, осуществляющих слияние внутриклеточных везикул с клеточной мембраной (экзоцитоз) [Sutton R.B. et al., 1998; Moqbel R., Coughlin J.J., 2006; Melo R.C. et al., 2009]. Первоначально эти белки были описаны в нервных клетках: VAMP-1 (vesicle-associated membrane protein), известный также как синаптобrevин-1, синтаксин-1 и SNAP-25 (synaptosome-associated protein 25 kDa) [Hogan S.P., 2008]. В последние годы появились данные зарубежных исследователей о том, что эозинофилы экспрессируют VAMP-2, VAMP-7, VAMP-8, синтаксин-4 и SNAP-23,

при этом не содержат классические SNARE белки нейронов (синтаксин-1, SNAP-25 и VAMP-1) [Feng D. et al., 2001; Lacy P. et al., 2001; Logan M.R. et al., 2002; Logan M.R. et al., 2006]. Эозинофильный VAMP-2 экспрессируется в популяции мелких секреторных пузырьков, депонирующих хемокин RANTES, который транспортируется к клеточной мембране при активации [Lacy P. et al., 2001; Spencer L.A. et al., 2009]. В свою очередь, синтаксин-4 и SNAP-23 локализованы в клеточной мембране эозинофилов, где они выполняют функцию внутриклеточных рецепторов для VAMP-2. VAMP-7 и VAMP-8 экспрессируются в кристаллических гранулах эозинофилов, при этом VAMP-7 необходим для экзоцитоза не только кристаллических гранул, но и малых секреторных везикул, что указывает на наличие у VAMP-2 и VAMP-7 дублирующих свойств [Logan M.R. et al., 2006]. Помимо SNARE, эозинофильные гранулоциты экспрессируют широкий спектр поверхностных маркеров.

1.2.2. Рецепторный аппарат эозинофильных гранулоцитов

Эозинофильные гранулоциты презентируют большое количество поверхностных маркеров, включая молекулы адгезии, апоптотические сигнальные молекулы, рецепторы к комплементу, иммуноглобулинам, хемокинам и цитокинам. Сравнительно недавно установлено, что эозинофилы несут на своей поверхности TLR (toll-like receptor), $\gamma\delta$ TCR, HLAII, тормозные рецепторы и сиглеки [Tachimoto H., Vochnner B.S., 2000; Hogan S.P. et al., 2004; Park Y.M., Vochnner B.S., 2010].

В числе локализованных на поверхности эозинофилов адгезивных молекул выделяют семейство селектиновых рецепторов, представленных L-селектином и сиалил- Le^X , за счет которых осуществляется первичная фиксация и «роллинг» циркулирующих эозинофилов *in vivo* [Wardlaw A.J., 1999]. Эозинофилы презентируют также CD162 или PSGL (P-selectin glycoprotein ligand) 1 и sialyl-Lewis \times (CD15s), которые взаимодействуют с E- и P-селектинами, регулируя непрочное связывание клеток с эндотелиоцитами [Symon F.A. et al., 1996]. В свою очередь, прочная адгезия эозинофилов и их трансэндотелиальная миграция из сосудов в ткани регулируется скоординированным взаимодействием молекул адгезии семейства интегринов: β_1 - ($\alpha_4\beta_1$ и $\alpha_6\beta_1$), β_2 - ($\alpha_L\beta_2$ - CD11b/CD18 (LFA-1),

$\alpha_M\beta_2$ - CD11a/CD18 (Mac-1) и $\alpha_X\beta_2$ - CD11c/CD18 (CR4)) и $\alpha_7(\alpha_4\beta_7)$, экспрессируемых на мембране эозинофилов, и молекул VCAM (vascular cell adhesion molecule) - 1, MAdCAM (mucosal addressin cell adhesion molecule) - 1 и ICAM (intercellular adhesion molecule) - 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; Johansson M.W. et al., 2013]. Дальнейшая миграция эозинофильных лейкоцитов в различные тканевые компартменты может осуществляться посредством активации различных адгезивных путей. Так, рекрутирование эозинофилов в тонкую кишку является MAdCAM-1/ $\alpha_4\beta_7$ -интегринзависимым процессом [Mishra A. et al., 2002], в то время как накопление эозинофилов в толстой кишке регулируется β_2 -интегринами (ICAM-1) [Forbes E. et al., 2006]. Рекрутирование эозинофилов к месту аллергического воспаления в легких и коже регулируется VLA (very late antigen) - 4 ($\alpha_4\beta_1$ -интегрин)/VCAM-1-зависимыми процессами [Gonzalo J.A. et al., 1996]. Примечательно, что молекулы адгезии LFA-1 экспрессируются на неактивированных клетках, в случае активации на мембране эозинофильных гранулоцитов появляются Mac-1, VLA-4, $\alpha_4\beta_7$ и др., усиливается экспрессия LFA-1.

Не вызывает сомнения тот факт, что миграция эозинофильных гранулоцитов в ткани осуществляется с непосредственным участием хемокиновых рецепторов. Эозинофилы экспрессируют рецепторы к семейству эотаксина (eotaxin-1 (CCL11), eotaxin-2 (CCL24) и eotaxin-3 (CCL26)); MIP (macrophage inflammatory protein)-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MCP (macrophage chemotactic protein)-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) и MEC (mucosa-associated epithelial chemokine) (CCL28). Было показано также, что эозинофилы несут на своей мембране CXCR3, CXCR4, CCR5, CCR6 и CCR8 после активации IL-5 [Nagase H. et al., 2000; Oliveira S.H. et al., 2002; Akuthota P. et al., 2013].

Методом проточной цитометрии на эозинофильных гранулоцитах идентифицированы рецепторы для многих цитокинов. Прежде всего, показано, что эозинофилы экспрессируют специфичные субъединицы рецепторов к IL-3 (IL-3RA, CD123), IL-5 (IL-5RA, CD125) и GM-CSF (GM-CSFRA, CD116), а также общую для этих рецепторов β -цепь (CD131) [Takatsu K. et al., 1994]. Кроме этого,

эозинофильные клетки презентуют c-kit рецептор (CD117), α -цепь $\text{IFN}\gamma\text{R}$ (CDw119), 1 и 2 типы рецепторов к $\text{TNF}\alpha$ (CD120a, CD120b), 1 тип рецептора к IL-4 (IL-4R α (CD124) и общую α -цепь (CD132)) и рецептор к IL-9 (IL-9R α -цепь (CD129)/CD132) [Hauber H.P. et al., 2004].

Мембрана эозинофилов несет также F_c -рецепторы для иммуноглобулинов (Ig) A, D, G и M [Kim J.T. et al., 1999]. Установлено, что CD32 ($\text{F}_c\gamma\text{RII}$) - рецептор для IgG - конститутивно экспрессируется на неактивированных эозинофилах человека и участвует в процессах выживания и дегрануляции клеток [Kim J.T. et al., 1999]. Высвобождение содержимого гранул эозинофилов может быть опосредовано также действием IgA [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006]. Спорным на сегодняшний день остается вопрос об экспрессии низкоаффинных и высокоаффинных рецепторов к IgE (CD23). Исследованиями последних лет показано, что эозинофилы презентуют незначительные количества рецепторных структур для иммуноглобулинов этого класса [Hogan S.P et al., 2008].

Кроме этого, на мембране эозинофилов представлены рецепторы для активированных компонентов комплемента: CR1 (CD35 - рецептор для C3b, C4b, iC3b и C1q), CR3, CR4 (CD11c) и CD103 [Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999]; простагландина D₂, лейкотриенов B₄, D₄, E₄ (CysLT1R (cysteinyl leukotriene receptor) и CysLT2R), гистамина (H₄-гистаминовый рецептор), эстрадиола и PAF [Hogan S.P. et al., 2008; Reher T.M. et al., 2012]. Особенностью эозинофильных гранулоцитов является наличие на их мембране рецепторов к кортикостероидам [Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003]. Вместе с тем, эозинофилы экспрессируют CD9 (молекула адгезии семейства тетраспанинов), CD37, CD52, CD63, CD81, CD82 и CD151, апоптотические сигнальные поверхностные структуры CD95 и CD69, а также костимулирующие молекулы, включая промежуточный поверхностный мембранный гликопротеин CD40, CD80 и CD86 [Woerly G. et al., 1999; Park Y.M., Vochner B.S., 2010; Xue F.M. et al., 2012; Akuthota P. et al., 2013]. Примечательно, что CD9 и CD35 являются маркерными молекулами эозинофильных гранулоцитов, позволяющими отличить их от нейтрофилов методом проточной цитометрии.

Помимо вышеописанных рецепторов, эозинофилы несут на своей мембране некоторые поверхностные структуры, которые, как полагали ранее,

экспрессируются исключительно другими типами клеток. Показано, что эозинофилы человека презентируют HLA-DR [Shi H., 2005]; mRNA TLR, включая TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 и TLR10 [Plotz S.G. et al., 2001; Nagase H. et al., 2003; Hogan S.P. et al., 2004; Reece P. et al., 2013], однако уровень экспрессии данных структур на эозинофилах сравнительно небольшой, исключение составляют лишь TLR2/TLR4 и TLR7/TLR8 [Nagase H. et al., 2003]. Кроме этого, эозинофильные гранулоциты презентируют тормозные рецепторы подсемейства CD2: CD48 (BLAST1) и 2B4 (CD244) [Munitz A. et al., 2005]; а также IRp60/CD300a, P140, Siglec (sialic acid-binding lectin) 8, Siglec-10, ILT5/LIR3 и CD33 молекулы адгезии ингибиторного рецептора. Установлено, что активация IRp60 опосредует подавление функциональной активности эозинофильных клеток [Munitz A., Levi-Schaffer F., 2005]. Активация Siglec-8, который содержит в своем составе ITIMs (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs), инициирует эффективный апоптоз эозинофилов. Ингибиторные рецепторы на эозинофильных гранулоцитах рассматривают в качестве новой молекулярной мишени прицельной коррекции количества эозинофилов в периферической крови при гиперэозинофилиях [Nutku E. et al., 2003; Na H.J. et al., 2012].

Приведенный перечень биологически активных веществ, выделяемых эозинофильными гранулоцитами, и разнообразие экспрессируемых ими рецепторных структур позволяет заключить, что эозинофилы обладают колоссальными возможностями для участия во многих процессах макроорганизма.

1.2.3. Основные функции эозинофильных гранулоцитов

Эозинофил является одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток воспаления, обладающих высоким цитотоксическим потенциалом. Основные процессы, опосредующие цитотоксичность эозинофильных лейкоцитов, осуществляются за счет кислороднезависимых механизмов микробицидности, которые реализуются посредством специфичных белков эозинофилов (главный основной протеин, эозинофильный катионный протеин, эозинофильная пероксидаза и эозинофильный нейротоксин) [Domachowske J.B. et al., 1998; Namann K.J. et al., 1999; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008].

Подробные механизмы цитотоксического действия эозинофильных протеинов были рассмотрены выше.

Немаловажную роль в осуществлении эффекторного потенциала эозинофильных лейкоцитов отводят метаболитам кислорода. Благодаря наличию ферментного комплекса - NADPH-оксидазы, окисляющего восстановленный никтинамидадениндинуклеотидфосфат (NADPH) с последующим переносом электрона на специфический мембранный цитохром b558 (который восстанавливает молекулярный кислород), происходит образование супероксидного анион-радикала. Последний при участии фермента СОД (супероксиддисмутаза) преобразуется в перекись водорода. Далее, под действием ЕРО и миелопероксидазы при участии галогенидов и псевдогалогенидов образуются дополнительные окислители, оказывающие мощное бактерицидное действие. Супероксид-анион также реагирует с NO с образованием пероксинитрила, диоксида азота и радикала гидроксила - веществ крайне токсичных для многих микроорганизмов [Lacy P. et al., 2003]. Согласно данным литературы, NADPH-оксидаза эозинофильных гранулоцитов характеризуется более выраженным характером экспрессии и особенностями локализации по сравнению с другими лейкоцитами. Так, J.L. Bankers-Fulbright et al. [2003] доказали, что в эозинофилах человека и мыши экспрессируется больше NADPH-оксидазы (чем в нейтрофилах), фермент при этом входит в состав плазматической мембраны клеток, тогда как для нейтрофилов установлена внутриклеточная его локализация. Это обусловлено особенностями киллерных свойств данных клеток: нейтрофильные гранулоциты осуществляют разрушение предварительно фагоцитированных объектов, эозинофилы же чаще уничтожают патоген путем секреции токсических метаболитов кислорода в межклеточное пространство [De Coursey T.E. et al., 2001; Bankers-Fulbright J. et al., 2001; Cherny V.V. et al., 2001; Lacy P. et al., 2003].

Анализируя сведения литературы о возможных механизмах микробицидности эозинофилов, можно заключить, что они разнообразны и во многом схожи с таковыми, осуществляемыми другими клетками. Изучение цитотоксического потенциала эозинофилов в эксперименте позволило установить способность

изученных клеток экспрессировать mRNA перфорина и гранзима В. D.G. Costain et al. [2001] использовали ингибиторы различных путей биоцидной активности эозинофилов перитонеальной полости мышей, инфицированных цистами гельминтов, в результате чего установили, что основным механизмом их токсического действия является гранзим В-зависимый [Комарова Л.С. и соавт., 2004; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Еще одним механизмом цитотоксического действия эозинофильных гранулоцитов является антителозависимая клеточная цитотоксичность [Бережная Н.М., Ковальчук Е.Б., 1991; Железникова, Г.Ф., 2002]. Известно, что IgE может опосредовать цитотоксичность многих клеток с киллерными свойствами (макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и др.). При этом IgE стимулирует не только цитотоксические свойства клеток, но и активирует другие функции: усиливает секрецию цитокинов полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами, инициирует кислородный взрыв в фагоцитах, индуцирует высвобождение многих биологически активных веществ тучными клетками, базофилами и др. [Медуницын Н.В., 1993; Литвинова Л.С. и соавт., 2007].

Наряду с выраженными цитотоксическими свойствами, эозинофильные гранулоциты обладают способностью к фагоцитозу. Эозинофилы являются макрофагами, которые мигрируют из циркуляции в очаг воспаления, где поглощают относительно небольшие растворимые антигены (гранулы тучных клеток, иммунные комплексы, бактерии) [Park Y.M., Vochnner B.S., 2010]. После поглощения объекта в эозинофильном гранулоците происходит резкая активация гексозомонофосфатного шунта, генерирующего восстановленный NADPH, с последующим образованием высокотоксичных супероксидных и нитроксидных радикалов, которые инициируют процессы перекисного окисления мембранных липидов клеточной стенки микроорганизмов [Lacy P. et al., 2003]. Являясь непрофессиональными фагоцитами эозинофилы, тем не менее, одними из первых (наряду с макрофагами и нейтрофилами) контактируют с чужеродным агентом и составляют основу эффекторной защитной реакции макроорганизма. Быстрая мобилизация эозинофилов дополняется их способностью в течение нескольких минут развивать метаболические процессы, приводящие к кислородному взрыву, а

также осуществлять выброс содержимого гранул, включающих предрасполагающие бактерицидные субстанции [Воробьев А.И., 2002, 2003].

Следует отметить, что эозинофильные лейкоциты выступают не только в качестве исполнительного звена в реализации воспалительных реакций макроорганизма, но и осуществляют иммунорегуляторную функцию [Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Speirs R.S. et al., 2009; Xue F.M. et al., 2012]. Как упоминалось ранее, эозинофилы презентуют на своей поверхности многочисленные рецепторы (TLR, $\gamma\delta$ TCR, HLAII, молекулы адгезии и др.) [Nagase H. et al., 2000, 2003; Munitz A., Levi-Schaffer F., 2005; Legrand F. et al., 2009; Reese P. et al., 2013]. В частности, экспрессия TLR2 и комплекса $\gamma\delta$ TCR-CD3, связывающих небелковые антигены бактерий, позволяет рассматривать эозинофилы в качестве антигенраспознающих клеток, реализующих свои потенции на первом этапе иммунной защиты [Legrand F. et al., 2009]. По некоторым данным, эозинофилы способны также выполнять антигенпрезентирующую функцию, осуществляя эффективный процессинг и представление антигенных детерминант различной природы иммунокомпетентным клеткам. Установлено, что эозинофильные гранулоциты экспрессируют умеренные уровни HLA II класса, а также костимулирующие молекулы CD86 (B7.2) и CD30L (CD153), необходимые для формирования так называемого иммунного синапса [Shi H., 2005; Le-Carlson M. et al., 2013]. S.D. Mawhorter et al. [1994] показали, что эозинофилы (при добавлении в культуру GM-CSF) повышали эффективный Т-клеточный пролиферативный ответ на стафилококковый суперантиген (стафилококковые энтеротоксины А, В и Е). Другими авторами было показано также, что при инкубации культуры эозинофильных гранулоцитов и CD4⁺ Т-лимфоцитов с риновирусом-16 человека отмечалось усиление Т-клеточной пролиферации и секреции ими IFN γ [Handzel Z.T. et al., 1998]. По мнению исследователей, невозможность зарегистрировать антигенпрезентирующие свойства эозинофилов может быть обусловлено лишь спецификой методики выделения этих клеток, поскольку доказано, что предварительный лизис эритроцитов хлористым аммонием - ингибитором лизосомального окисления (необходимого для презентации антигена) отрицательно

коррелировал с антигенпредставляющей активностью эозинофилов *in vitro* [Shi H.Z. et al., 2000; Van Rijt L.S. et al., 2003].

Наряду с распознаванием и презентацией антигена эозинофилы секретируют свыше 30 различных цитокинов, включая медиаторы с провоспалительной (IL-2, IL-12, IFN γ , TNF α), противовоспалительной (IL-4, IL-5, IL-13) и иммуносупрессорной (IL10, TGF β) активностью, участвующие в реализации и регуляции Th1- и Th2-опосредованного иммунного ответа [Lacy P., Moqbel R., 2000; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Moqbel R., Coughlin J.J., 2006; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Speirs R.S. et al., 2009; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Xue F.M. et al., 2012; Dias P.M., Banerjee G., 2013]. Основные медиаторы, секретируемые эозинофильными гранулоцитами, представлены в таблице 1. Небезынтересной, на наш взгляд, является способность эозинофилов синтезировать фермент IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) [Odemuyiwa S.O. et al., 2004], вовлеченный в окислительный метаболизм триптофана, катализирующий превращение последнего в кинуренин, который в свою очередь регулируют Th1/Th2-баланс, усиливая апоптоз Th1-лимфоцитов [Shevach E.M., 2012; Shevach E.M., Davidson T., 2012]. В результате между клетками иммунной системы и эозинофилами возможно формирование взаимонаправленных эффектов, обусловленных как иммуномодулирующим действием иммунокомпетентных клеток, так и способностью эозинофильных лейкоцитов активировать лимфоциты, вызывая поляризацию иммунного ответа, направляя его по одному из вариантов развития: клеточному или гуморальному.

Таким образом, к настоящему моменту произошло значительное расширение представлений о функциональных возможностях эозинофильных клеток. Идентифицированы новые, ранее неизвестные компоненты гранул эозинофилов, цитокиновые молекулы и поверхностные рецепторные структуры, что указывает на способность эозинофильных клеток принимать участие в патогенезе не только аллергических заболеваний и паразитарных инвазий (как полагали ранее), но и играть существенную роль в механизмах формирования бактериальных и вирусных инфекций, сопровождающихся эозинофильной реакцией крови.

1.3. Эозинофильная реакция крови: определение, классификация, механизм развития

Термин «эозинофилия» обозначает состояние, при котором отмечается повышение числа эозинофильных гранулоцитов в периферической крови более $0,350 \times 10^9/\text{л}$ или свыше 5% в гемограмме [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Rothenberg M.E. et al., 2007; Hogan S.P. et al., 2008; Spencer L.A. et al., 2009; Park Y.M., Vochnner B.S., 2010]. На сегодняшний день не существует единой классификации эозинофильной реакции крови. Некоторые авторы выделяют умеренную (количество эозинофилов свыше 10 - 15 % в гемограмме) и выраженную (количество эозинофилов свыше 15 - 20 % в гемограмме) эозинофилию [Marchand E. et al., 2006; Takatsu K. et al., 2008]. В абсолютных единицах содержание эозинофилов от 0,5 до $1,5 \times 10^9/\text{л}$ расценивается как легкая эозинофилия, а свыше $1,5 \times 10^9/\text{л}$ - большая эозинофилия крови или гиперэозинофилия: умеренная ($1,5 - 5,0 \times 10^9/\text{л}$) и выраженная (более $5,0 \times 10^9/\text{л}$) [Shamri R. et al., 2010]. Другие исследователи подразделяют эозинофилию на слабую (600 - 1500 клеток в 1 мкл), среднюю (1500 - 5000 клеток в 1 мкл) и сильную (более 5000 клеток в 1 мкл) [Tefferi A. et al., 2005, 2006].

Весьма часто эозинофилия крови (гемическая эозинофилия) сочетается с инфильтрацией эозинофильными гранулоцитами тканей - тканевая эозинофилия [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Воробьев А.И. и соавт., 2002].

Согласно общепринятому мнению, эозинофилия сопровождает аллергические заболевания (бронхиальная астма, атопический дерматит и др.), гельминтозы (описторхоз, аскаридоз, эхинококкоз, трихинеллез и др.) и болезни кожи (псориаз, экзема, эксфолиативный дерматит и др.) [Озерецковская Н.Н., 2000; Wardlaw A.J., 2001; Ячник А.И., Победенная Г.П., 2005; Абдулкадыров К.М., 2006; Eltboli O., Brightling S.E., 2013]. Однако в настоящее время значительно расширился спектр нозологий, ассоциированных с данной гематологической реакцией. Имеются многочисленные описания эозинофилии при опухолевых заболеваниях (рак легких, рак почки, рак желудка, поджелудочной железы, шейки матки, яичников и др.)

[Воробьев А.И., 2003; Бережная Н.М. и соавт., 2005; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005], а также гемобластозах, происходящих из клеток-предшественниц лимфо- и миелопоэза [Merz H. et al., 1991; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Абдулкадыров К.М., 2006; Литвинова Л.С. и соавт., 2007]. Большое количество зарубежных работ посвящено описанию эозинофилии при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (эозинофильный гастроэнтерит, аллергические колит, эозинофильный эзофагит и гастроэзофагальная рефлюксная болезнь) [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Dellon E.S., 2013]. Эозинофилия может обнаруживаться также при заболеваниях сердца и сосудов, что обосновывает необходимость проведения дифференциальной диагностики патологии эндокарда и сосудистой стенки [Touze J.E. et al., 1998; Мокиева Р.А. и соавт., 2000; Абдулкадыров К.М., 2006; Vaandrup U., 2012].

Эозинофильная реакция крови может возникать в результате приема целого ряда лекарственных препаратов (противотуберкулезные препараты, антибиотики, ацетилсалициловая кислота, анальгин и др.) [Larfars G. et al., 1996; Sezer O. et al., 1999]. Лекарственная эозинофилия чаще протекает бессимптомно и является единственным проявлением аллергической настроенности макроорганизма [Шиффман Фред Дж., 2000; Анаев Э.Х., 2002].

Редкими считаются эозинофилии аутоиммунной природы, сопровождающие такие заболевания как эндокардит Леффлера, эозинофильный миозит и фасциит, эозинофильный цистит и др. [Логинов А.С. и соавт., 1998; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Vaandrup U., 2012].

С недавнего времени в зарубежной литературе стали появляться сообщения о возникновении эозинофилии крови при заболеваниях, вызванных *Respiratory syncytial virus*, *Epshtein-Barr virus*, *Borrelia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes* и др. [Svensson L., Wenneras C., 2005; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Linch N.S. et al., 2009]. Однако однозначная интерпретация причин и целесообразности возникновения данной гематологической реакции при инфекционных заболеваниях, ассоциированных с Th1-зависимым иммунным ответом, представляется затруднительной. Весь перечень заболеваний, сопровождающихся эозинофилией крови, представлен в таблице 2.

Таблица 2

Заболевания, сопровождающиеся эозинофильной реакцией крови

№	Заболевания и синдромы
1.	Аллергические заболевания (бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит, поллиноз, крапивница и др.)
2.	Инфекции: - паразитарные (описторхоз, лямблиоз, трихинеллез, шистосомоз, эхинококкоз) - бактериальные (туберкулез, бруцеллез, туляремия, лепра, скарлатина) - вирусные (инфекционный мононуклеоз, гепатиты А, В и С, РС-инфекция) - грибковые (аспергиллез, бластомикоз, гистоплазмоз)
3.	Опухолевые заболевания (рак желудка, гипернефроидный рак почки, рак легких, поджелудочной железы, толстого кишечника, шейки матки, яичников, лимфо- и миелопролиферативные заболевания системы крови).
4.	Заболевания кожи и подкожной клетчатки (экссфолиативный дерматит, экзема, пузырчатка, псориаз и др.).
5.	Желудочно-кишечные заболевания (эозинофильный эзофагит, эозинофильный гастроэнтерит, энтероколит, колит)
6.	Синдромы эозинофильных инфильтратов в легких (простая эозинофильная пневмония (синдром Леффлера), острая и хроническая эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия).
7.	Коллагенозы, системные васкулиты (узелковый периартериит, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, саркоидоз, эозинофильный фасциит и миозит и др.).
8.	Иммунные нарушения (реакция «трансплантат против хозяина», врожденный дефицит IgA, синдром Уискотта-Олдрича, гипериммуноглобулинемия E).
9.	Применение лекарственных препаратов (сульфаниламидные, противотуберкулезные препараты, антибиотики, ацетилсалициловая кислота, анальгин и др.)
10.	Идиопатический гиперэозинофильный синдром
11.	Прочие заболевания (гипофункция надпочечников, цирроз печени, семейная эозинофилия).

Примечание: по данным Э.Х. Анаева [2002]; А.И. Воробьева [2003]; А.Г. Чучалина [2003]; Н.М. Бережной и соавт. [2005]; Л.С. Литвиновой и соавт. [2007]; М.Е. Rothenberg, S.P. Hogan [2006]; S.P. Hogan et al. [2008]; N.S. Linch et al. [2009]; Y.M. Park, B.S. Bochner [2010]; U. Vaandrup [2012]; S. Ghosh et al. [2013]

Независимо от причины все эозинофилии (по механизму развития) подразделяют на первичные и вторичные. Первичная эозинофилия включает клональный и идиопатический (неясной этиологии) варианты [Tefferi A. et al., 2010]. Клональная эозинофилия является одним из проявлений трансформации миелоидных клеток и может сопровождать острый миелобластный и

миеломонобластный лейкоз с $inv(16) t(16;16)$, Ph BCR/ABL-позитивный хронический миелоцитарный лейкоз, миелодиспластический синдром и другие миелопролиферативные заболевания (хронический эозинофильный лейкоз, системный мастоцитоз и др.) [Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005; Tefferi A. et al., 2006].

Формирование клональной эозинофилии опосредовано неконтролируемой пролиферацией клеток эозинофильного ростка, характерным признаком которой является обнаружение в циркулирующих эозинофилах, а также в клетках костного мозга молекулярно-генетических перестроек. Идентифицирована микроделеция в хромосоме 4q12, которая приводит к слиянию неизвестного гена, кодирующего последовательность гомологичную дрожжевому белку FIP1, и обозначаемому FIP1 или FIP1-L1 и гена, кодирующего цитоплазматический домен рецептора тромбоцитарного фактора роста α (PDGFRA - platelet-derived growth factor receptor A) [Cools J. et al., 2003; Griffin J.H. et al., 2003]. Образовавшийся фьюжн-ген транскрибируется и транслируется в конститутивную тирозинкиназу FIP-L1-PDGFR α , которая направляет дифференцировку клеток-предшественниц в эозинофилы. Данная тирозинкиназа зарегистрирована при системном мастоцитозе и хроническом эозинофильном лейкозе [Cools J. et al., 2003; Li B. et al., 2012].

Наряду с этим, установлены мутации, затрагивающие гены, кодирующие β -цепь рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR β) и рецептор фактора роста фибробластов 1 (FGFR1), которые также приводят к появлению эозинофил-активирующих тирозинкиназ [Heldin C.H., Westermark B., 1999]. Так ген, кодирующий PDGFR β , локализован на хромосоме 5q33. Транслокации данного гена с участками других хромосом $t(5;12)(q33; p13)$, $t(5;10)(q33;q21)$, $t(5;7)(q33;q11.2)$, $t(5;14)(q33;q13)$, $t(5;17)(q33;p11)$ и $t(1;5)(q23;q33)$ обнаружены у пациентов с хроническим эозинофильным лейкозом, хроническим миелоцитарным и миеломоноцитарным лейкозами [Macdonald D. et al., 2002]. В свою очередь, ген FGFR1 располагается на хромосоме 8p11, транслокации $t(8;13)(p11;q12)$, $t(8;9)(p11;q33)$, $t(6;8)(q27;p11)$ и $t(8;22)(p11;q22)$ регистрируются при различных вариантах острого миелоидного лейкоза. Другие варианты, включающие $t(8;17)(p11;q25)$, $t(8;11)(p11;p15)$, $t(8;12)(p11;q15)$, $ins(12;8)(p11;p21)$,

ассоциированы с системным мастоцитозом и острыми лейкозами [Sohal J. et al., 2001].

При отсутствии цитогенетического подтверждения клонального характера эозинофилии и невозможности обоснования симптоматической природы данной гематологической реакции выставляется диагноз «идиопатическая эозинофилия» или «идиопатический гиперэозинофильный синдром» (в зарубежной литературе HES - hypereosinophilic syndrome). Диагностические критерии HES включают стойкое повышение количества эозинофилов в крови свыше $1,5 \times 10^9/\text{л}$, продолжительностью более 6 месяцев; отсутствие общеизвестных причин, вызывающих эозинофилию (аллергия, гельминтозы и др.); появление признаков патологии внутренних органов (кардиомиопатия, поражение ЦНС и др.) [Cools J. et al., 2003; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005; Gleich G.J., Leiferman K.M., 2005; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Vaandrup U., 2012]. По данным F. Roufosse, E. Cogan [2003], в некоторых случаях в крови больных HES обнаруживались клоны Th2-лимфоцитов, продуцирующие IL-4 и IL-5, что указывает на реактивный характер эозинофилии.

90% всех эозинофилий составляют вторичные (реактивные или симптоматические), сопровождающие аллергические заболевания и паразитозы, бактериальные и вирусные инфекции, коллагенозы, васкулиты и др. Использование лекарственных химиопрепаратов и введение в организм некоторых биологически активных веществ может быть причиной реактивных эозинофилий [Воробьев А.И., 2002; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005]. Согласно данным M.E. Rothenberg et al. [1987], для вторичной эозинофилии характерен ускоренный процесс созревания эозинофилов в костном мозге, тогда как при клональном варианте данной гематологической реакции увеличение содержания эозинофилов в костно-мозговом компартменте чаще сочетается с существенным отставанием клеточной дифференцировки [Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005]. В основе формирования вторичной эозинофилии лежит гиперсекреция цитокинов и факторов роста, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов.

1.3.1. Цитокиноопосредованные механизмы формирования эозинофилии крови

Ключевым цитокином, модулирующим функции эозинофилов, считается IL-5 (эозинофилопоэтин), первоначально названный фактором роста II В-лимфоцитов [Kubin R., 1991; Kay A.B. et al., 1997; Kotsimbos A.T., Hamid Q., 1997; Намазова Л.С. и соавт., 2000; Kusano S. et al., 2012]. IL-5 - гомодимер с молекулярной массой 45 - 50 кДа, вариабельность его молекулярного веса обусловлена разной степенью гликозилирования белка, синтезируемого различными типами клеток. Изучение полной аминокислотной последовательности IL-5 выявило высокую степень гомологии (равную 70%) этого медиатора у мыши и человека [Zaks-Zilberman M. et al., 2008; Kouro T. et al., 2009].

IL-5 избирательно усиливает дифференцировку эозинофильных гранулоцитов из их коммитированного предшественника в костном мозге, одновременно увеличивая пролиферацию КОЕ-Эо. Наряду с активацией эозинофилопоэза IL-5 индуцирует терминальные стадии созревания эозинофилов и выход последних в периферическую кровь [Takatsu K. et al., 2008; Kusano S. et al., 2012]. Важная роль IL-5 в процессах пролиферации и дифференцировки эозинофильных гранулоцитов была продемонстрирована во многих экспериментах. У IL-5-трансгенных мышей была зарегистрирована гиперпродукция IL-5, которая сопровождалась выраженной эозинофилией [Lee J. et al., 1997; Mishra A. et al., 2002], а удаление гена IL5, напротив, приводило к снижению количества эозинофилов в крови и ткани легкого при введении аллергена [Rothenberg M.E. et al., 2007]. Решающее значение IL-5 в регуляции выхода эозинофилов в кровоток было показано в ходе клинических испытаний гуманизированных анти-IL-5-антител, у всех обследованных лиц отмечалось резкое снижение числа эозинофилов в крови и в меньшей степени в ткани легких [Leckie M.J. et al., 2000; Kips J.C. et al., 2003].

IL-5 совместно с IL-3 и GM-CSF активирует дегрануляцию эозинофилов, высвобождение цитотоксичных белков и генерацию активных форм кислорода, ингибирует апоптоз лейкоцитов эозинофильного ряда, тем самым продлевая время их пребывания в циркуляции [Mordvinov V.A. et al., 2001; Nagase H. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002; Barnes P.J., 2003; Takatsu K. et al., 2009; Morshed M. et al., 2012].

IL-5 обладает хемотаксической активностью в отношении эозинофилов крови, увеличивая экспрессию молекул адгезии на мембране лейкоцитов (LFA-1, Mac-1, VLA-4 и $\alpha 4\beta 7$) и клетках сосудистого эндотелия (ICAM-1, 2, 3) [Wise E.L. et al., 2010; Kusano S. et al., 2012]. Однако роль IL-5 в индукции эозинофилопосредованного воспаления представляется неоднозначной, что продемонстрировано на примере бронхиальной астмы. Так, у *IL5*-трансгенных мышей, экспрессирующих высокие уровни IL-5, при введении аллергена регистрировались эозинофильная инфильтрация легких, гиперплазия и гипертрофия эпителиальных клеток, и гиперреактивность дыхательных путей. Введение животным анти-IL-5-антител или растворимой формы рецептора к IL-5 нивелировало гиперэозинофилию, однако не влияло на степень бронхиальной гиперреактивности, сохранялась эозинофильная инфильтрация [Kougo T. et al., 2009]. Кроме этого, установлено, что антиген-индуцированная тканевая эозинофилия может развиваться у IL-5-дефицитных мышей [Foster P. et al., 1996; Hogan S.P. et al., 1997]. Все это обусловлено способностью IL-5 кооперироваться с эотаксином (специфический хематрактант эозинофилов) в индукции эозинофилии тканей. Показано, что IL-5 увеличивает пул клеток, несущих CCR3 (рецептор для эотаксина), и праймирует эозинофилы в отношении этого лиганда [Zimmermann N. et al., 2003].

Основными клетками-продуцентами IL-5 являются активированные Th2-лимфоциты, В-лимфоциты, тучные клетки (при стимуляции комплексом аллерген-IgE), цитотоксические Т-лимфоциты, НК-клетки и сами эозинофильные гранулоциты [Hong S.-J. et al., 2005; Johnson V.J. et al., 2008; Endo Y. et al., 2011; Wolterink R.G. et al., 2012]. Способность эозинофилов самостоятельно секретировать IL-5 в значительных концентрациях обуславливает факт аутокринного механизма длительного пребывания эозинофилов в кровотоке.

Реализация многочисленных функций IL-5 осуществляется при связывании со специфическим рецептором (IL-5R), представленном на мембране эозинофильных гранулоцитов. IL-5R относится к семейству цитокиновых рецепторов I типа, которое включает также рецепторные структуры для IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7,

GM-CSF, G-CSF и эритропоэтина [Kabesch M. et al., 2007; Fukushima Y. et al., 2012].

IL-5R - интегральный мембранный гликопротеин, который состоит из двух нековалентно связанных субъединиц, неравнозначных по функциональному значению. Так, α -субъединица (IL-5RA/CD125, внеклеточный домен), представленная растворимой и мембраносвязанной формами, отвечает за специфичное связывание с IL-5. β -цепь (bc/CD131), общая с IL-3 и GM-CSF, сама по себе не связывает лиганд, ее цитоплазматический домен опосредует внутриклеточное проведение сигнала от комплекса IL-5RA/IL-5, одновременно увеличивая сродство α -субъединицы к IL-5 [Takatsu K., 2011]. Примечательно, что мембраносвязанная форма α -цепи при взаимодействии с β -субъединицей приводит к увеличению аффинности рецептора к IL-5, тогда как растворимая форма (soluble (s) IL-5RA), ассоциированная с IL-5, оказывает обратный эффект на клетки-мишени [Tavernier J. et al., 1991, 2000; Patino E. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012]. В исследованиях *in vitro* показана способность sIL-5RA, конкурирующего с мембраносвязанной формой за связывание с цитокином, нейтрализовать действие одноименного медиатора в механизмах ограничения IL-5-опосредованного иммунного ответа [Liu X.Q. et al., 2008].

Взаимодействие IL-5 со своим рецептором приводит к формированию внутриклеточного сигнала, активации экспрессии определенных генов и, как следствие изменению функциональной активности клетки. Для IL-5 идентифицированы несколько сигнальных путей: JAK (Janus kinase)/STAT (signal transducers and activators of transcription), Ras-МАРК (Ras-mitogen-activated protein kinase) и PI₃-киназный. Установлено, что JAK2 ассоциирована с IL-5RA, а JAK1 - связана с β -субъединицей в нестимулированных клетках. После связывания лиганда JAKs взаимно активируются трансфосфорилированием, а затем фосфорилируют несколько остатков тирозина на β -субъединице (Y577, Y612, Y695 и Y750). Фосфорилированные киназами сигнального каскада STAT-белки перемещаются в ядро, связываются со специфическими последовательностями ДНК и регулируют транскрипцию соответствующих генов [Patino E. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012]. По мнению J. Wang et al. [2007], в процессах

пролиферации и дифференцировки эозинофильных гранулоцитов ключевую роль играет именно JAK/STAT-путь.

Еще одним медиатором, регулирующим функциональную активность эозинофильных гранулоцитов, считается эотаксин, который первоначально был обнаружен в эксперименте на морских свинках при попытке идентифицировать молекулы, опосредующие формирование аллерген-индуцированного эозинофильного воспаления легких [Rankin S.M. et al., 2000; Rothenberg M.E. et al., 2007; Tedeschi A. et al., 2012]. Впоследствии с применением геномного анализа были установлены два дополнительных гена цитокинов с эозинофил-специфичной хемотрактантной активностью, которые были обозначены соответственно eotaxin-2 (CCL24) и eotaxin-3 (CCL26) [Zimmermann N. et al., 2003]. Гены CCL24 и CCL26 человека локализованы на хромосоме 17q11.2 в кластере CC-хемокинов, в свою очередь ген eotaxin-1 (CCL11) картирован на хромосоме 7q11.2 [Wise E.L. et al., 2010]. CCL24 и CCL26 имеют лишь 30% гомологии последовательности с CCL11, но, несмотря на это, все три хемокина оказывают сходные эффекты, реализуя свое действие через специфический рецептор [Zimmermann N. et al., 2000].

Многочисленные экспериментальные исследования позволили установить, что эотаксины секретируются резидентными тканевыми элементами (эпителиальными клетками дыхательной и пищеварительной систем, фибробластами кожи) и клетками, индуцированными антигеном (аллергеном) (макрофагами и эозинофильными гранулоцитами) [Haley K.J. et al., 2008; Paplinska M. et al., 2007; Manqieri D. et al., 2012].

Основная роль CCL11 заключается в активации хемотаксиса эозинофилов из кровотока в ткани и обратной их рециркуляции в кровеносное русло. По мнению некоторых авторов, данный процесс осуществляется за счет инициации полимеризации внутриклеточного актина, что является необходимым условием для реализации направленного движения клеток в очаг воспаления [Dent G. et al., 2004; Lintomen L. et al., 2008; Tedeschi A. et al., 2012]. В тканях CCL11 индуцирует дегрануляцию эозинофилов и продукцию активных форм кислорода, выступая в роли провоспалительного агента [Matthews A.N. et al., 1998].

Особенности взаимосвязи секреции эотаксинов с рекрутированием эозинофильных гранулоцитов в ткани описаны многими зарубежными исследователями на лабораторных животных. Согласно данным D.M. Conroy et al. [2001], после введения аллергена сенсibilизированным морским свинкам пиковое значение CCL11 в легочной ткани регистрировалось в течение первых 6 ч, затем снижалось. Однако появление эозинофильных гранулоцитов в бронхоальвеолярном лаваже наблюдалось только спустя 12-24 ч, что могло быть обусловлено накоплением eotaxin-1 в просвете воздухоносных путей в результате перераспределения градиента медиатора. Последующее введение антител к хемокину приводило к значительному снижению количества эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже у алергизованных морских свинок [Conroy D.M. et al., 2001; Dolgachev V. et al., 2008; Haley K.J. et al., 2008; Tedeschi A. et al., 2012]. Как свидетельствуют результаты исследований N. Zimmermann et al. [2003], введение аллергена в легочную ткань мышей сопровождалось увеличением концентрации только eotaxin-1 (через 6 ч), что коррелировало с последующим накоплением тканевых эозинофилов, при этом высокая концентрация eotaxin-2, ассоциированная с рекрутированием эозинофилов, отмечалась в течение 24 ч, повышение уровня мРНК eotaxin-3 было зарегистрировано только через 24 ч. Изучение тканевой эозинофилии у мышей другими авторами показало, что эотаксины не являются облигатными факторами трансэпителиальной миграции эозинофилов в ткань легких, а могут участвовать лишь в трансэндотелиальном пути проникновения клеток в просвет дыхательных путей. Присутствие IL-5 способствовало доступности периферического пула эозинофилов и усиливало экскрецию других хемотаксических факторов, в том числе eotaxin-1 [Huaux F. et al., 2005; Haley K.J. et al., 2008].

Наряду с IL-5, потенциальным посредником секреции эотаксинов является IL-4, основные свойства которого были установлены в ряде экспериментальных работ. Так, внутрикожное введение IL-4 индуцировало наработку eotaxin-1, опосредующее накопление эозинофилов в легочной ткани крыс. Установлен также синергестический эффект IL-4 с провоспалительным цитокином TNF α , в результате чего увеличивалась продукция eotaxin-1 фибробластами легких. При

этом введение анти-IL-4-антител ингибировало экспрессию мРНК эотаксинов в ткани легких [Fischer R. et al., 2007; Johnson V.J. et al., 2008; Endo Y. et al., 2011; Wolterink R.G. et al., 2012]. Более мощным (чем IL-4) индуктором секреции эотаксинов эпителиальными клетками легких *in vivo* считается IL-13, инициирующий эозинофильную инфильтрацию бронхиального дерева, гиперсекрецию слизи, субэпителиальный фиброз и гиперреактивность бронхов [Palikhe N.S. et al., 2010]. Это подтверждается результатами исследований, продемонстрировавшими отсутствие бронхиальной гиперреактивности и эозинофильной инфильтрации дыхательных путей у мышей при введении им ингибиторов IL-13, несмотря на наличие гемической эозинофилии [Ландышев Ю.С. и соавт., 2008]. Установлено, что IL-4 и IL-13 индуцируют секрецию эотаксинов по STAT6-зависимому пути, что объясняет комплексный механизм формирования эозинофилии крови и тканей, ассоциированной с превалированием Th2-иммунного ответа [Zimmermann N. et al., 2003; Voehringer D. et al., 2004; Zafrani M. P. et al., 2012].

Эозинофилы человека характеризуются высокой экспрессией рецепторов для эотаксинов - CCR3, которые впервые были идентифицированы J. Combadiere et al. в 1995 году [Kitaura M. et al., 1996; Rothenberg M.D., 1999]. По своей структуре CCR3 имеет 62 % идентичности аминокислотных последовательностей с CCR1 и включает семь трансмембранных доменов, связанных с G-белками [Kitaura M. et al., 1996; Ponath P.D. et al., 1996]. Ген *CCR3* человека картирован на хромосоме 3p21 в 285 Kb регионе от генов *CCR1* и *CCR2* [Bullock J.Z. et al., 2007; Miyagaki T. et al., 2010; Akuthota P. et al., 2013]. Помимо эозинофильных гранулоцитов CCR3 представлен также на базофилах, тимоцитах, эндотелиальных клетках и Т-лимфоцитах. Кроме этого, данный рецептор обнаруживается на мембране дендритных клеток и микроглиальных клеток головного мозга [Ugucioni M. et al., 1997]. По сведениям U. Forssmann et al. [1997], взаимодействие с CCR3 обуславливает проникновение вируса иммунодефицита человека (HIV) 1-го типа в клетки микроглии, а также усиливает HIV-специфическую Т-клеточную активность.

Основная функция CCR3 заключается в активации хемотаксиса эозинофилов, а также дегрануляции эозинофилов в очаге воспаления [Daugherty B.L. et al., 1996; Heath H. et al., 1997; Akuthota P. et al., 2013]. Экспериментальными исследованиями показано отсутствие рекрутирования эозинофильных гранулоцитов в ткань легких у CCR3-дефицитных мышей при сенсibilизации овальбумином [Pope S.M. et al., 2005]. Однако возможна и негативная регуляция функции эозинофилов через CCR3, что обусловлено набором медиаторов клеточного микроокружения. Так, например, предварительная обработка клеток хемокином MIP-1 тормозила направленное движение эозинофилов в воспалительный инфильтрат посредством CCR3 и Rac2-зависимых механизмов [Fulkerson P.C. et al., 2005; Manqieri D. et al., 2012].

Следует отметить, что помимо эотаксинов и IL-5, реализующих свои свойства через специфические рецепторы, в современной литературе описаны другие регуляторы функций эозинофильных гранулоцитов.

Основным фактором, стимулирующим процессы пролиферации и дифференцировки эозинофилов на ранних стадиях созревания клеток, является IL-3. Последний обладает свойствами универсального регулятора гемопоэза, поскольку стимулирует рост и дифференцировку мультипотентных и унипотентных стволовых клеток-предшественниц [Кашкин К.Е., 1998; Kay A.V. et al., 1997]. При этом IL-3 необходим не только на ранних стадиях развития эозинофилов, он ингибирует апоптоз эозинофильных лейкоцитов, усиливает антителозависимую клеточную цитотоксичность, а также инициирует накопление гиподенсной субпопуляции эозинофилов [Nagase H. et al., 2001; Steinke J.W., 2002]. Основными продуцентами IL-3 являются Th1- и Th2-лимфоциты, стимулированные антигенами, цитотоксические Т-лимфоциты, NK-клетки, тучные клетки, эпителиальные клетки тимуса и моноциты [Murphy J.M. et al., 2008].

Другим регулятором пролиферации и дифференцировки клеток-предшественниц мононуклеарных и полиморфноядерных лейкоцитов, в том числе эозинофилов, является GM-CSF, секретируемый Т-лимфоцитами, макрофагами, эндотелиальными клетками, фибробластами и др. [Murphy J.M. et al., 2008; Hercus T.R. et al., 2012]. Помимо стимуляции клеток-предшественниц GM-CSF

обеспечивает поступление зрелых клеток в кровоток и дальнейшую их активацию в кровеносном русле: увеличивает экспрессию молекул адгезии CD11a и CD11b, усиливает микробицидные свойства, окислительный метаболизм и фагоцитарную активность нейтрофилов и эозинофилов *in vivo* [Murphy J.M. et al., 2006; Ishino T. et al., 2008]. В концентрациях пг/мл и нг/мл GM-CSF усиливает хемотаксис эозинофилов [Hercus T. R. et al., 2012].

Свои основные эффекты IL-3 и GM-CSF реализуют через специфические рецепторы, экспрессируемые на мембране эозинофилов, нейтрофилов и других клеток миелоидного ряда. IL-3R и GM-CSFR состоят из двух субъединиц, при этом полипептидная β -цепь является общей с IL-5R [Rothenberg, M.D., 1998; Tavernier J., 2000; Cook E.B. et al., 2012]. Согласно данным литературы, существование перекрестного связывания IL-5, IL-3 и GM-CSF с рецепторами обусловлено меньшим числом β -субъединиц, что лимитирует степень активации эозинофильных гранулоцитов [Lopez A.F. et al., 1992]. В то же время при взаимодействии эозинофил-активирующих цитокинов с α -цепью комплементарного рецептора в клетке происходит запуск каскада реакций с первоначальным фосфорилированием цитоплазматических протеинов и β -субъединицы рецептора [Murphy J.M. et al., 2008].

Еще одним индуктором накопления эозинофилов *in vivo* является IL-4, который (как упоминалось ранее) совместно с TNF α и молекулами адгезии (семейства β_2 -интегринов и ICAMs) усиливает экспрессию mRNA эотаксина эпителиальными клетками различной локализации [Rothenberg M.E. et al., 1995; Serrano D. et al., 1997; Воробьев А.И., 2002; Cook E.B. et al., 2012]. Однако активация эозинофилов в реализации IL-4-опосредованных реакций может быть следствием не только Th2-зависимой индукции секреции эотаксина. IL-4 в сочетании с IL-13 и TNF α , увеличивая экспрессию молекул CD69 на мембране эозинофильных гранулоцитов, вызывает блок танатогенной программы клеток, тем самым продлевая их пребывание в периферической крови [Hartnell A. et al., 1993; Luttmann W. et al., 1999; Nopp A. et al., 2000; Xu Y.Y. et al., 2012]. Более выраженный антиапоптотический эффект отмечается при взаимодействии IL-4 и IL-13 с IL-5 [Воробьев А.И., 2002].

Существенную роль в регуляции выживаемости эозинофилов играет TNF α , который действует через усиление секреции эозинофил-активирующего цитокина - GM-CSF [Rubira G.N., 2000; Temkin V., Levi-Schaffer F., 2001; Steinke J.W., 2002; Hercus T.R. et al., 2012]. При участии TNF α может осуществляться также эозинофил-опосредованный лизис клеток-мишеней. В основе TNF α -зависимой цитотоксичности клеток лежит активация EPO, что объясняет деструктивные изменения тканей при гельминтозах и опухолях, ассоциированных с эозинофилией, в условиях гиперсекреции TNF α [Бережная Н.М., 2000; Cook E.V. et al., 2012].

Активирующим влиянием на эозинофильные гранулоциты обладают также многие другие факторы: MCP (monocyte-chemoattractant protein - протеин-хемоаттрактант для моноцитов) и RANTES (regulated upon activation, normal T expressed and secreted), оказывающие мощное хемотаксическое действие; PAF (platelet activated factor - фактор активации тромбоцитов), при участии которого на мембране эозинофилов повышается экспрессия молекул CD9, опосредующих процесс агрегации и адгезии клеток к фибронектину, усиливаются высвобождение эозинофильных катионных белков и генерация реактивных соединений кислорода в межклеточное пространство [Воробьев А.И., 2002; Morshed M. et al., 2012].

Анализируя основные эффекты медиаторов, опосредующих формирование эозинофилии крови при патологии, необходимо учитывать, что продукция цитокинов и экспрессия рецепторных структур генетически детерминированы. 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 тому или иному заболеванию [Sehmi R., 1997; Фрейдин М.Б. и соавт., 2004; Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J. H. et al., 2007].

1.3.2. Структурные основы функционального полиморфизма генов эозинофил-активирующих цитокинов и их рецепторов

Реализация проекта по расшифровке генома человека позволила установить, что гены разных людей при почти полной идентичности не абсолютно одинаковы. Каждый индивид имеет в той или иной степени уникальные геномные

последовательности. Частой причиной существования нескольких различающихся по структурно-функциональной организации форм гена являются точечные мутации – замены единичных нуклеотидов или так называемый полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP - single-nucleotide polymorphism). Эти генетические различия определяют индивидуальные особенности развития защитно-приспособительных реакций макроорганизма и его наследственную предрасположенность или резистентность к заболеваниям, индивидуальную чувствительность к лекарственным препаратам и т.д. [Lander E.S. et al., 2001; Симбирцев А.С., 2005; Кофиади И.А., 2006; Онищенко Г.Г. и соавт., 2008; Ризванова Ф.Ф. и соавт., 2010].

Полиморфизм единичных нуклеотидов может быть связан как с кодирующими, так и некодирующими районами генов цитокинов. SNP в экзонах (кодирующих областях) встречается достаточно редко (примерно 5 % всех выявляемых точечных мутаций), основная часть их элиминируется в процессе репарации ДНК, поскольку они существенно изменяют структурно-функциональный статус кодируемого белка [Wagner H.M., 1994; Guasch J.F., 1996; Weiner M.P., 2002; Rowe S.M., 2005; Кофиади И.А., 2006; Абрамов Д.Д. и соавт., 2011]. До настоящего времени основное внимание авторов при проведении молекулярно-генетических исследований было сосредоточено на выявлении и изучении SNP именно в кодирующих районах генов и сайтах сплайсинга [Krawszak S. et al., 2000], поскольку результат таких SNP легко поддается детекции и интерпретации.

Основная масса выявляемых SNP-замен располагается в некодируемых областях, т.е. затрагивает регуляторные участки генов (область промотора), что не влияет на последовательность аминокислот в транслируемом белке. Часть SNP может определенным образом изменять скорость транскрипции генов, влиять на стабильность и сплайсинг мРНК, что приводит к повышению/снижению содержания синтезируемого продукта или изменению уровня его активности. Данный феномен получил название «функционального аллельного полиморфизма гена» [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005].

Аллельный полиморфизм генов лежит в основе развития многих мультифакториальных заболеваний, таких как сахарный диабет, ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, бронхиальная астма, опухоли и др. Для большинства заболеваний с генетической предрасположенностью описаны «генные сети». Каждая такая сеть включает главные (центральные) гены, координирующие функции остальных элементов, и дополнительные (вспомогательные) - гены-модификаторы, которые ускоряют и усугубляют течение патологического процесса [Баранов В.С. и соавт., 2000].

Наиболее значимыми с позиции протекания воспалительного ответа и специфических форм иммунных реакций организма является аллельный полиморфизм генов биологически-активных молекул, обеспечивающих распознавание антигенных детерминант, проведение внутриклеточного сигнала и синтез медиаторов развития воспаления, к которым относятся цитокины [Громова А.Ю., Симбирцев А.С., 2005; Абрамов Д.Д. и соавт., 2011].

Примечательно, что гены практически всех цитокинов являются индуцибельными, запуск которых определяется взаимодействием транскрипционных факторов с энхансерной последовательностью промоторного региона гена. Промоторы генов цитокинов и их рецепторов, в свою очередь, характеризуются также полиморфностью структуры, что проявляется в изменении количества синтезируемого белкового продукта [Коненков В.И. и соавт., 2006; Ризванова Ф.Ф. и соавт., 2010; Цыган В.Н. и соавт., 2011]. На сегодняшний день наибольшее число аллельных вариантов генов цитокинов идентифицировано для их промоторных областей, однонуклеотидные замены в промоторах не отражаются на структуре кодируемых генами продуктов, однако изменяют степень экспрессии контролируемого гена. Влияние полиморфизма на транскрипцию гена реализуется путем изменения структуры сайтов связывания для факторов транскрипции внутри промотора или изменения участков присоединения транскрипционных факторов в ядре, обуславливающего изменение структуры промоторов [Сенников С.В. и соавт., 2001, 2002; Коненков В.И., Смольникова М.В., 2003].

На сегодняшний день накоплены многочисленные сведения литературы об ассоциациях аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с характером

секреции соответствующих продуктов и предрасположенностью к определенным заболеваниям [Пузырев В.П. и соавт., 2002; Огородова Л.М. и соавт., 2005; Фрейдин М.Б. и соавт., 2006; Landi S. et al., 2006; Hsieh Y.Y. et al., 2007; Рудко А.А. и соавт., 2008]. При этом результаты, полученные разными исследователями весьма неоднозначны и порой противоречивы. Доказано, что существенное влияние на характер распределения SNP оказывает принадлежность индивидуумов к разным расам или даже проживание на разных территориях [Kim Y.K. et al., 2007; Moreno O. et al., 2007; Rasouli M., 2007]. Изучение распространенности полиморфных генов-кандидатов мультифакториальных заболеваний является актуальным для формирования групп предрасположенности к сложно наследуемым заболеваниям, в том числе и инфекционной природы [Кучер А.Н. и соавт., 2009].

В различных популяциях мира установлены ассоциации ТЛ с генами многих цитокинов (*IL1B*, *IL12B*, *IL8*, *IL10*, *IFNG*, *TNFA* и др.) и генами рецепторных структур (*HLA-DQ/DR*, *TLR2*, *IL1RA*, *IL12RB1* и др.) [Пузырев В.П. и соавт., 2002; Lopez-Maderuelo D. et al., 2003; Имангулова М.М. и соавт., 2005; Гончарова И.А. и соавт., 2006; Фрейдин М.Б. и соавт., 2006; Keller C. et al., 2006]. В литературе представлены описания исследований по нахождению связи туберкулезной инфекции с полиморфизмом генов, кодирующих цитокины гуморального иммунного ответа [Шевченко А.В. и соавт., 2010; Ridruechai C. et al., 2010], многие из которых обладают эозинофил-активирующими свойствами.

1.3.3. Связь аллельного полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов с формированием эозинофилии крови при заболеваниях

Как уже упоминалось ранее, ключевым медиатором, опосредующим формирование эозинофилии крови, является IL-5.

Известно, что IL-5 кодируется геном, локализованным между генами *IL3*, *IL4*, *IL9*, *IL13* и *GMCSF*, которые расположены одним кластером на участке q31 хромосомы 5. В промоторе гена *IL5* обнаружены несколько полиморфных сайтов, единичные замены нуклеотидов в которых оказывают влияние на наработку исследуемого белка [Kabesch M. et al., 2007].

Наиболее изученным является функциональный полиморфизм гена *IL5* в положении 703 промоторной области, характеризующийся заменой цитозина на тимин (*C-703T*). Так, М.Б. Фрейдин и соавт. [2002] установили ассоциацию функционального полиморфизма *C-703T* гена *IL5* с бронхиальной астмой и высоким количеством эозинофилов в периферической крови. При этом, по данным И.С. Поповой и соавт. [2004], аллель *C* полиморфизма *C-703* гена *IL5* важен для реализации воспалительного ответа при бронхиальной астме. А J.D. Rioux et al. [1998] обнаружили, что аллель *C* и генотип *CC* полиморфизма *C-703 T* гена *IL5* чаще встречались у больных с семейной гиперэозинофилией. N. Yamamoto et al. [2003] выяснили, что данный полиморфизм ассоциирован с высоким уровнем эозинофилов в периферической крови также при atopическом дерматите в японской популяции. В свою очередь, А.В. Карповой [2009] было установлено, что одним из факторов риска развития atopического дерматита, напротив, является наличие аллеля *T* и генотипа *TT* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5*.

Указывая на важную роль *IL-5* в патогенезе atopического дерматита, исследователи обнаружили ассоциацию другого полиморфизма *-4597 T/A* гена *IL5* с сывороточным уровнем IgE, эозинофильного катионного протеина, а также эозинофилией крови при данном заболевании. Группой ученых под руководством J.-H. Namkung [2007] были продолжены эти исследования в корейской популяции. Установлено, что полиморфизм *-4597 T/A* гена *IL5* ассоциирован с atopическим дерматитом, однако достоверной связи аллелей *T* и *A* данного полиморфного сайта с концентрацией *IL-5* в сыворотке крови найдено не было. Большинство данных литературы свидетельствует о том, что многие полиморфные варианты гена *IL5* и его рецептора обуславливают общую подверженность к atopии [Огородова Л.М. и соавт., 2002; Фрейдин М.В. и соавт., 2002; Воронько О.Е. и соавт., 2010].

На сегодняшний день выявлен полиморфизм в положении 746 промоторной области гена *IL5*, который приводит к замене цитозина на тимин. Установлено, что аллель *T*, а также генотип *TT* данного полиморфизма имеют протективный эффект в отношении бронхиальной астмы [Kabesch M. et al., 2007]. Показано также, что данный полиморфизм ассоциирован со сниженными спирометрическими показателями: объемом форсированного выдоха и форсированной жизненной

емкостью легких при бронхиальной астме у детей в корейской популяции [Hong S.-J. et al., 2005] и высоким уровнем эозинофилов в периферической крови при atopическом дерматите в японской популяции [Yamamoto N. et al., 2003]. E. Lianes et al. [2009] предприняли попытку найти ассоциацию вышеназванного полиморфизма с аллергией на пыльцу оливы в Испании, однако, статистически значимых результатов получено не было. Недавними исследованиями показано также, что аллель *T* и гомозиготный генотип *TT* полиморфизма *C-746 T* гена *IL5* чаще встречаются у пациентов с болезнью Грейвса в стадии ремиссии по сравнению со здоровыми донорами [Inoue N. et al., 2011]. В то же время результаты других исследователей указывают на то, что аллель *C* (а не аллель *T*) данного полиморфизма ассоциирован с болезнью Грейвса и офтальмопатией при этом заболевании [Zhu W. et al., 2010].

В последние годы активно проводятся исследования, касающиеся ассоциации полиморфизма гена *IL5* не только с аллергической патологией, но и другими заболеваниями инфекционной и неинфекционной природы. M.K. Ellis et al. [2007] была предпринята попытка установить связь семи полиморфных сайтов гена *IL5* с заболеваемостью азиатским и африканским шистосомозом, а также с носительством этих инфекций. Авторам удалось продемонстрировать ассоциацию азиатского шистосомоза с двумя полиморфизмами гена *IL5*. В свою очередь, E.B. Калмыковой [2009] установлено, что полиморфизм *C-703 T* гена *IL5* ассоциирован с особенностями проявления и характером прогрессирования хронического гломерулонефрита.

Другой немаловажной группой заболеваний, с которыми удалось найти связь полиморфных сайтов гена *IL5*, являются злокачественные опухоли. R. Mahajan et al. [2008] показали, что носительство гомозиготного генотипа *TT* полиморфизма *-745 C>T* гена *IL5* играет протективную роль при развитии рака желудка. Этот же полиморфизм исследовали M.J. Gunter et al. [2006] при колоректальной аденоме, однако достоверной связи с развитием данного заболевания авторами выявлено не было. Y. Chen et al. [2011] установлено, что гомозиготный *TT* и гетерозиготный *CT* генотипы полиморфного сайта в положении *-745* ассоциированы с повышенным

риском развития неходжкинской В-клеточной лимфомы у женщин, имеющих ИМТ (индекс массы тела) более 25 кг/м².

Особый интерес, на наш взгляд, представляют результаты изучения гена рецептора к IL-5 (*IL5R*). В данном гене имеется как минимум несколько областей с единичными нуклеотидными заменами. Это единичные нуклеотидные замены гуанина на аденин в положениях: -80 ($G \rightarrow A$) и -5091 ($G \rightarrow A$), которые вызывают изменения на уровне экспрессии рецептора к IL-5, т.е. являются функциональными [Lida A. et al., 2004].

По данным литературы, полиморфизм *G-80A* гена *IL5RA* ассоциирован с повышенной экспрессией данного рецептора и возникновением эозинофильной реакции при бронхиальной астме и атопическом дерматите [Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J.H. et al., 2007; June-Нуук Lee et al., 2007]. Однако группой исследователей во главе с S. Hoffjan [2004], занимающихся изучением 61 полиморфизма 35 генов у больных бронхиальной астмой, не выявлено статистически значимой связи *G-80A* гена *IL5RA* с развитием этого заболевания, а также с уровнем эозинофилов в периферической крови при нем.

С более высокой экспрессией IL-5RA и повышенным количеством эозинофилов в периферической крови при бронхиальной астме связан также аллель *A* полиморфизма гена *IL5RA* в положении -5091, который повышает транскрипционную активность гена *IL5RA* и соответственно экспрессию самого рецептора [Lee J.-H. et al., 2007]. Однако существует ряд работ, не подтвердивших влияние полиморфизма в промоторной области -5091 на эффективность транскрипции гена *IL5RA*. J.-H. Namkung et al. [2007] исследовали 12 полиморфизмов гена *IL5RA*, для двух из которых была найдена ассоциация с гемической эозинофилией и сывороточной концентрацией эозинофильного катионного протеина при атопическом дерматите.

Как упоминалось ранее, другим кандидатом, ответственным за развитие эозинофильной реакции крови, является *eotaxin-1*.

В локусе гена *eotaxin-1* обнаружены по меньшей мере 6 полиморфных сайтов в промоторной области (нуклеотидные позиции: -1328, -426, -384, -329, -67, +123). Все эти замены представляют миссенс-мутации, т.е. SNP. В процессе

многочисленных исследований по выявлению возможных ассоциаций генетической вариабельности секреции *eotaxin-1* установлено, что функционально значимый полиморфизм гена этого медиатора регистрируется только для трех полиморфных участков: *-1328*, *-426*, *-384* промоторной области. Т.-N. Wang et al. [2007, 2010] показали, что полиморфизм данного гена в положении *-384* ассоциирован с высокой концентрацией эотаксина и уровнем общего IgE в сыворотке крови при атопии. Однако связь вышеописанного полиморфизма с атопической бронхиальной астмой в тайваньской популяции ученым доказать не удалось. В свою очередь, К.А. Attab et al. [2008] установили, что частота гомозигот по генотипу *GG* в позиции *-384* возрастала при бронхиальной астме в Иорданской популяции. Другой независимой группой исследователей во главе с Y. Tsunemi [2002], изучавшей различные полиморфизмы гена *eotaxin-1* при атопическом дерматите, было установлено, что полиморфизмы *C-426T*, *A-384G* и *G-67A* не были ассоциированы с развитием атопического дерматита в японской популяции. Полученные ими результаты показывают, что генотипы *TT* и *CT* полиморфного сайта в положении *-426*, а также генотип *GG* положения *-384* гена *eotaxin-1* ассоциированы с низким содержанием IgE в сыворотке крови у больных атопическим дерматитом; связи вышеописанных полиморфизмов с уровнем эозинофилов в периферической крови при данном заболевании учеными установлено не было.

Изучение другого полиморфизма гена *eotaxin-1* Y. Nakamura et al. [2005], которые изучали концентрацию медиатора у больных бронхиальной астмой, позволило констатировать, что генотип *AA* и аллель *A* полиморфного сайта в положении *-67* ассоциированы с более низкой концентрацией *eotaxin-1*, а также низким количеством эозинофилов в периферической крови. Исследователями данной группы было показано, исследователями установлено, что генотип *AA* имеет протективную роль при бронхиальной астме [Tsunemi Y. et al., 2002]. Другой независимой группой исследователей, изучавшей полиморфизмы семейства эотаксинов при бронхиальной астме, установлено, что полиморфизм в положении *-1328* с заменой гуанина на аденин ассоциирован с количеством общего IgE у

пациентов с данным заболеванием. Однако ассоциации этого полиморфизма с бронхиальной астмой выявлено не было [Shin H.D. et al., 2003].

Примечательно, что полиморфизм гена *eotaxin-1* хорошо изучен и при некоторых онкологических заболеваниях. В частности D. Wagsater et al. [2007] показали, что у больных раком прямой кишки преобладал аллель *G* полиморфизма *A-384G*. Ими же отмечен более низкий уровень *eotaxin-1* в плазме у больных раком толстой кишки.

В гене рецептора для эотаксинов (*CCR3*) обнаружено 10 полиморфных участков в положениях: -22557, -520, -174, +517, +240, +652, +824, +827, +828 и +1052. Для двух из них (-22557 *G>A* и -174*C>T*) показана ассоциация с высоким количеством эозинофилов в крови у пациентов с бронхиальной астмой. Для полиморфизма -520 *T>G*, -174*C>T* и +51 *T>C* идентифицирована связь с развитием бронхиальной астмы в японской и британской популяциях [Fukunaga K. et al., 2001]. В то же время J.-H. Lee et al. [2007] установили, что сочетание аллелей *A* (22557 *G>A*), *G* (-520 *T>G*), а также аллелей *T* (-174*C>T*) и (+51 *T>C*) ассоциировано с низким количеством эозинофилов периферической крови у больных бронхиальной астмой.

Согласно данным литературы, полиморфизм гена *CCR3* ассоциирован не только с бронхиальной астмой, но и атопическим дерматитом, множественным склерозом, а также с гепатитом С и HIV (human immunodeficiency virus) инфекцией [Bugeja M.J. et al, 2006; Al-Abdulhadi S.A. et al., 2010]. Хотя S. Hellier et al. [2003], исследовавшие связь различных единичных нуклеотидных замен в промоторе гена *CCR3* у больных гепатитом С с персистенцией вирусной инфекции, тяжестью заболевания и степенью активности воспалительного процесса в печени, не выявили достоверной связи. Другой группой исследователей во главе с Y. Tsunemi [2003] также не установлено достоверной ассоциации полиморфизма в положении -51 гена *CCR3* с развитием атопического дерматита в японской популяции.

Таким образом, функциональный полиморфизм генов эозинофил-активирующих факторов обуславливает генетически запрограммированный высокий уровень соответствующих медиаторов и гиперэкспрессию рецепторных структур, что приводит к развитию эозинофилии крови при патологии.

1.4. Значение эозинофильной реакции крови при патологии

1.4.1. Роль эозинофилии в патогенезе неинфекционных заболеваний

Эозинофилия является отличительной чертой многих аллергических заболеваний, в том числе бронхиальной астмы, атопического дерматита, аллергического ринита и др. [Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003; Kay A.V. et al., 2004; Barthel S.R. et al., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Ghosh S. et al., 2013; Schleich F.N. et al., 2013]. Известно, что эти заболевания характеризуются функциональной несостоятельностью Th1-зависимого иммунного ответа с превалированием реакций антителообразования [Ячник А.И., Победенная Г.П., 2005; Hahn C. et al., 2006; Tong J. et al., 2006]. Так, бронхиальная астма протекает с преимущественной секрецией Th2-цитокинов, индуцирующих наработку плазматическими клетками IgE или IgG₄, которые, фиксируясь на тучных клетках, опосредуют выброс медиаторов аллергии и последующую аккумуляцию эозинофильных гранулоцитов в ткани бронхов [Hamelmann E., Gelfand E.W., 2001; Fulkerson P.C. et al., 2006; Dias P.M., Banerjee G., 2013]. Участие эозинофилов в патогенезе аллергических реакций обусловлено экспрессией на их мембране рецепторов для Fc-фрагмента молекулы IgE II-го типа (FcεRII). В результате взаимодействия IgE-FcεRII происходит дегрануляция эозинофилов с высвобождением широкого спектра факторов, многие из которых обладают инактивирующим влиянием в отношении медиаторов клеток-мишеней I-го порядка. Наряду с этим, эозинофилы активно фагоцитируют гранулы тучных клеток, тем самым нивелируя действие гистамина, субстанций анафилаксии и других биологически активных веществ на ткани. Разрешение реакции гиперчувствительности немедленного типа сопровождается восстановлением тучных клеток при непосредственном участии эозинофилов, выполняющих репаративную функцию [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Анаев Э.Х., 2002; Воробьев А.И., 2003].

В то же время, в литературе имеются многочисленные сведения о том, что эозинофилы, обладая существенным арсеналом агрессивных цитотоксических факторов, инициируют повреждение тканей и связанных с ними нервных волокон [Бережная Н.М. и соавт., 2000, 2005; Чучалин, А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт.,

2004; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Campos L.E. M. et al., 2009; Vaandrup U., 2012]. Так, основные эозинофильные гранулярные белки опосредуют деструкцию эпителия бронхов и альвеол при бронхиальной астме, способствуя формированию бронхо-альвеолярной гиперреактивности [Lacy P. et al., 2003; Schleich F.N. et al., 2013]. Кроме этого, эозинофильные катионные протеины, препятствуя секреции эпителиальными клетками бронхов муцина, нарушают функции мукоциллиарного клиренса бронхиального дерева при антигенной нагрузке [Hogan S.P. et al., 2008; Eltboli O., Brightling C.E., 2013]. Показано также, что эозинофильные гранулоциты пациентов с бронхиальной астмой имеют ряд фенотипических изменений, связанных главным образом с их адгезивными свойствами. В частности, по данным S.R. Barthel et al. [2006], эозинофилы дыхательных путей после антигенной стимуляции обладали повышенной адгезией к VCAM-1 (CD106), альбумину, ICAM-1 (CD54), фибриногену и витронектину. В то же время, S. Bazan-Socha et al. [2006] показали, что на эозинофилах у больных бронхиальной астмой отмечалась повышенная экспрессия рецепторов к коллагену и интегринам $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$. Специфическое взаимодействие активированных молекул адгезии поверхности клетки с адгезивными рецепторами эндотелия облегчает миграцию эозинофилов в различные тканевые компартменты при воспалении. Кроме этого, большое внимание исследователей уделяется возможной роли эозинофилов в процессах ремоделирования дыхательных путей [Schleich F.N. et al., 2013]. В частности, в зарубежной литературе приводятся сведения о наличии ассоциации между тканевой эозинофилией, дегрануляцией эозинофильных лейкоцитов и некоторыми фиброзными синдромами [Kay A.B. et al., 2004; Eltboli O., Brightling C.E., 2013]. Доказано, что эозинофилы являются источником многих фиброгенных факторов, включая трансформирующие факторы роста (TGF) α и β , фактор роста фибробластов 2, фактор роста эндотелия сосудов, матричную металлопротеиназу 9, IL-1 β , IL-13 и IL-17 [Fulkerson P.C. et al., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Dias P.M., Banerjee G., 2013]. В свою очередь, следствием ремоделирования является утолщение стенки дыхательных путей (за счет увеличения массы гладкомышечной ткани, отложения коллагена и других белков матрикса, формирования новых кровеносных сосудов), что приводит к сужению просвета бронхов и

формированию их гиперреактивности. По мнению некоторых авторов, эозинофилы принимают непосредственное участие в обострении бронхиальной астмы [Green R.H. et al., 2002; Lewis T.C. et al., 2012; Ghosh S. et al., 2013].

Повышенное содержание эозинофилов в крови может служить негативным прогностическим признаком и при некоторых опухолевых заболеваниях. В ряде случаев эозинофильная реакция крови является одним из ранних признаков прогрессии опухолевого процесса [Воробьев А.И. и соавт., 2000; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. По данным О.В. Зеленовой и соавт. [2002], при лимфогранулематозе активированные эозинофилы взаимодействуют с мембранными структурами клеток Рида-Березовского-Штернберга и посредством активации механизмов сигнальной трансдукции опосредуют пролиферацию трансформированных клеток-мишеней. Ю.Ю. Лорие [2000] указал на существенную роль эозинофильных гранулоцитов в процессе ангиогенеза опухоли и образовании ее микроокружения при В-клеточных неходжкинских лимфомах. Однако в некоторых случаях эозинофильная реакция крови и инфильтрация эозинофилами очага опухолевой трансформации коррелируют с благоприятным прогнозом опухолевого процесса. По сведениям Y. Ohashi et al. [2000], аккумуляция эозинофилов в области плоскоклеточной карциномы пищевода оказалась более выраженной при отсутствии метастазов, что позволило заключить об участии эозинофильных гранулоцитов в защите против метастазирования. Работы R.A. Caruso et al. [2004] подтвердили факт взаимодействия эозинофилов с клетками интестинальной карциномы желудка, следствием чего явились дегенеративные изменения опухоли. Вместе с тем, некоторые авторы указывают на ассоциацию положительных результатов терапии рекомбинантными цитокинами с выраженностью эозинофильной реакции крови при гемобластозах и других опухолевых заболеваниях [Гершанович М.Л., 2003; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. При этом постулируется, что противоопухолевая активность эозинофилов обусловлена их цитотоксическим действием [Legrand F. et al., 2009].

Механизм развития гемической и тканевой эозинофилии при опухолевых заболеваниях, за исключением злокачественной трансформации самих эозинофилов, чаще связан со способностью опухолевых клеток нарабатывать

эозинофил-активирующие факторы [Воробьев А.И. и соавт., 2000; Зеленова О.В. и соавт., 2002]. Так, M.A. Ionescu et al. [2005] зарегистрировали высокие уровни секреции IL-5, IL-3 и GM-CSF опухолевыми клетками при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови. З.Г. Кадагидзе [2003] показал, что клетки опухолей способны секретировать IL-4, который через комплементарные рецепторы ингибирует рост опухоли. Установлена также высокая экспрессия трансформированными клетками хемокина RANTES, активирующего накопление эозинофилов в очаге опухолевого процесса [Флеминг М.В. и соавт., 2005; Чердынцева Н.В. и соавт., 2006]. При этом исследователи констатируют факт положительной корреляции между гиперсекрецией данного хемокина и прогрессией опухоли. Наряду с этим, опухолевые клетки способны модулировать цитокинсекреторную активность иммунокомпетентных клеток: повышать синтез IL-6 – при миеломной болезни; IL-2, TNF α и IL-10 – при лимфопролиферативных заболеваниях [Bonnekoh V. et al., 2002; Wolff D. et al., 2004]. Существует мнение о том, что эозинофильная реакция крови при опухолевых заболеваниях представляет собой сложную форму иммунного ответа на антигенные детерминанты опухолевых клеток. В литературе имеются описания редких случаев ходжкинских и неходжкинских лимфом, ассоциированных с выраженной гемической эозинофилией, при которых регистрировался высокий уровень секреции лимфоцитами и моноцитами периферической крови ключевых цитокинов, стимулирующих эозинофилы [Зеленова О.В. соавт., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005; Литвинова Л.С. и соавт., 2007].

Следует отметить, что эозинофилия может сопровождать и другие заболевания неинфекционной природы. В частности, у пациентов с аутоиммунным системным склерозом выявлены повышенные уровни главного основного протеина в сыворотке крови и отложения этого белка в коже и ткани легкого. На основании этого авторами был сделан вывод о том, что эозинофилы могут быть вовлечены в формирование кожного и легочного фиброза [Viallard J.F. et al., 2001]. Эозинофилия является общей и отличительной чертой первичного билиарного цирроза и может служить диагностическим признаком этого заболевания

[Yamazaki K. et al., 1996]. В биоптатах печени у таких больных обнаружена повышенная экспрессия mRNA IL-5 [Nagano T. et al., 1999].

В последние годы зарубежные исследователи активно занимаются изучением эозинофил-ассоциированных желудочно-кишечных заболеваний (эозинофильного эзофагита, эозинофильного гастрита, эозинофильного гастроэнтерита, эозинофильного энтерита и эозинофильного колита), представляющих собой воспалительные изменения слизистой оболочки органов желудочно-кишечного тракта с выраженным эозинофильным компонентом при отсутствии известных причин эозинофилии (паразитарные инфекции, опухоли) [Guajardo J.R. et al., 2002; Khan S., Orenstein S.R., 2002; De Brosse C.W., Rothenberg M.E., 2008; Hogan S.P. et al., 2008; Blom K. et al., 2012; Dellon E.S., 2013; Straumann A. et al., 2013]. По мнению Н.А. Sampson [1999], эозинофил-ассоциированные желудочно-кишечные расстройства занимают промежуточное положение между истинной IgE-зависимой пищевой аллергией и клеточно-опосредованной гиперчувствительностью (целиакия). Значение гемической и тканевой эозинофилии в патогенезе этих заболеваний в настоящее время изучается. Например, показано, что при эозинофильном эзофагите эозинофилы участвуют в ремоделировании пищевода. Установлено, в частности, что вырабатываемые эозинофилами TGF β и его сигнальная молекула SMAD2/3 ответственны за развитие фиброза в эзофагальной субэпителиальной области [Aceves S.S. et al., 2007]. При воспалительных заболеваниях кишечника (болезнь Крона, язвенный колит) эозинофилы составляют небольшой процент инфильтрирующих лейкоцитов, однако их уровень является отрицательным прогностическим признаком заболевания [Nishitani H. et al., 1998; Blom K. et al., 2012]. Эозинофилия может сопровождать также феномен «трансплантат против хозяина», особенно его желудочно-кишечный и кожный варианты, при которых аллогенные Т-лимфоциты донора, продуцирующие IL-5, инициируют эозинофильную реакцию крови [Schaffer J.V., 2006].

1.4.2. Роль эозинофилии в патогенезе заболеваний инфекционной природы

Широко известно, что эозинофилия может сопровождать многие инфекционные заболевания, в том числе паразитарные инвазии. Выраженная

эозинофилия крови сопровождается гельминтозы, как правило, на стадии миграции и локализации личинок паразита в тканевых компартментах макроорганизма. Эозинофильную реакцию крови регистрируют при описторхозе, аскаридозе, эхинококкозе, трихинеллезе, филяриозе и др. [Озерецковская Н.Н., 2000; Карбышева Н.В. и соавт., 2001; Железникова Г.Ф., 2002; Klion A.D., Nutman T.V., 2004; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Hogan S.P. et al., 2008].

Реакция макроорганизма на антигены гельминтов развивается по типу продукцией Th2-цитокинов, образованием IgE-антител плазматическими клетками, эозинофилией крови и тканей, преобладанием процесса фиброобразования в финальной стадии болезни [Озерецковская Н.Н., 2000; Карбышева Н.В. и соавт., 2001; Воробьев А.И., 2003]. При гельминтозах тканевые эозинофилы экспрессируют на мембране высокоаффинные рецепторы к IgE (FcεRI и FcεRII), несут поверхностный маркер активации эозинофилов (CD69), обладают повышенными адгезивными свойствами и способностью секретировать иммунорегуляторные молекулы (IL-4, IL-5, GM-CSF, TNFα и др.). Взаимодействие FcεRI и FcεRII, представленных на эозинофильных гранулоцитах, с антигенспецифическими антителами типа IgE, связанными Fab-фрагментами с личинками гельминтов, приводит к высвобождению эозинофильных цитотоксических факторов и метаболитов кислорода, которые повреждают кутикулу паразита [Карбышева Н.В. и соавт., 2001]. Примечательно, что поздняя фаза аллергических реакций типа I сопровождается формированием клеточного инфильтрата, представленного эозинофилами (преобладают), тучными клетками и лимфоцитами. Параллельно аккумуляции эозинофилов в области воспалительной реакции осуществляется массивная стимуляция фибробластов, функциональная активность которых обуславливает разрешение септического воспаления [Железникова Г.Ф., 2002; Литвинова Л.С. и соавт., 2007; Simon D., Simon H.-U., 2007].

Таким образом, эозинофильные гранулоциты, несомненно, осуществляют протективную роль в патогенезе паразитарных инфекций. Данный тезис подтверждается результатами экспериментальных исследований, в которых эозинофилы человека, активированные добавлением в культуру антител и/или

компонентов комплемента, а также изолированные секреторные компоненты гранул эозинофилов (главный основной протеин, эозинофильная пероксидаза) значительно сокращали жизнеспособность различных гельминтов *in vitro* [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008]. В экспериментах на мышцах, инфицированных *Nematodes Strongyloides* и *Angiostrongylus*, было установлено, что эозинофилы опосредуют снижение паразитарной нагрузки и предотвращают повторное заражение (реинфекцию). В частности, M. Kogenaga et al. [1991] продемонстрировали повышенный уровень размножения *S. venezuelensis* в легких у мышей с анэозинофилией, получавших моноклональные антиIL-5 антитела. В свою очередь, T. Yoshida et al. [1996] показали длительное выживание *A. cantonensis* у IL-5R α -дефицитных мышей. Кроме этого, по данным A.R. De Jesus et al. [2004], R.M. Reiman et al. [2006], эозинофилы способны участвовать в процессах ремоделирования поврежденных тканей при гельминтозах.

В то же время, некоторые исследователи оспаривают исключительно защитную роль эозинофилов при инфекционных заболеваниях, вызываемых гельминтами. Очевидно, что высокий цитотоксический потенциал активированных клеток может реализовываться не только в отношении патогена, но и клеток макроорганизма, обуславливая развитие осложнений. По мнению зарубежных авторов, практически любое заболевание, ассоциированное с длительной эозинофилией, сопровождается повреждением сосудистого эндотелия, эндо- и миокарда. Так, J.J. Andy et al. [1998] диагностировали признаки эндомикардиальной болезни у пациентов с паразитарными инфекциями (шистосомоз, стронгилоидоз) и опухолями различной локализации, связанными с гиперэозинофилией. A.D. Klion et al. [2004], фиксируя у мышей, инфицированных *Toxocara canis*, эозинофильную реакцию крови, регистрировали признаки эндокардита и альвеолита с накоплением эозинофильных катионных белков в тканях эндокарда и легких. Другие авторы описывают эозинофильную инфильтрацию легких, желудка, двенадцатиперстной кишки и фатерова соска, толстого кишечника, а также поджелудочной железы при хроническом описторхозе [Белобородова Э.И., Колосовская Т.А., 1986; Озерецковская Н.Н., 2000; Черногорюк Г.Э., 2002].

Менее изученными на сегодняшний день остаются эозинофилии, сопровождающие бактериальные и вирусные инфекции. С недавнего времени в зарубежной литературе стали появляться сообщения о роли эозинофильных гранулоцитов при заболеваниях, вызванных *Respiratory syncytial virus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus pyogenes* и др., в которых исследователи описывают возможные причины, механизмы развития и последствия феномена эозинофилии при данных видах патологии [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Simon D., Simon H.-U., 2007; Hogan S.P. et al., 2008; Kirman J. et al., 2009].

Согласно современным представлениям, эозинофилия не является характерным симптомом заболеваний бактериальной и вирусной природы, ассоциированных с активацией преимущественно Th1-лимфоцитов. Однако известно, что поляризация иммунного ответа по пути доминирования одного из его вариантов не является абсолютной. Любой патологический процесс сопровождается цитокиновым дисбалансом, который в ряде случаев может обуславливать усиление процессов пролиферации, дифференцировки и активации лейкоцитов эозинофильного ряда. Вместе с тем, открытие новых компонентов гранул эозинофилов, разнообразных цитокиновых молекул и поверхностных рецепторных структур, указывает на то, что эти клетки в полной мере могут быть вовлечены в механизмы антибактериальной и противовирусной защиты. Так, F. Legrand et al. [2009] показали, что эозинофильные гранулоциты, экспрессирующие TLR2, способны взаимодействовать с *M. tuberculosis*, в результате чего происходит высвобождение α -дефензинов и эозинофильной пероксидазы, инициирующих повреждение клеточной стенки и последующий лизис бактерий. Этими же авторами было установлено, что микобактерии могут также активировать эозинофильные клетки через $\gamma\delta$ TCR с последующей их дегрануляцией и секрецией активных форм кислорода, оксида азота, цитотоксических протеинов и цитокинов [Legrand F. et al., 2009]. По мнению S. Yousefi et al. [2008, 2012], антибактериальная роль эозинофилов может быть опосредована экспульсией митохондриальной ДНК. Наряду с этим, в неспецифических гранулах эозинофилов и их предшественников обнаружен еще один представитель эндогенных антимикробных пептидов - бактерицидный белок, повышающий проницаемость клеток (BPI), который

способен связываться и нейтрализовать бактериальные липополисахариды. Антибактериальная активность этого белка в большей степени выражена в отношении грамотрицательных бактерий, включая *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* и *Enterobacter sp.* [Calafat By Jero et al., 1998]. Протективная роль эозинофильных клеток и их цитотоксических факторов показана также при сепсисе, вызываемом *Pseudomonas aeruginosa* [Linch N.S. et al., 2009]. Авторами была зарегистрирована обратная корреляционная зависимость между количеством циркулирующих эозинофилов и тяжестью заболевания. Высказываются предположения о возможном использовании отдельных гранулярных белков в качестве адьювантной терапии при тяжелом течении инфекционного процесса. Приведенные выше данные согласуются с результатами исследований L. Svensson, C. Wenneras [2005], демонстрирующими высокую антибактериальную активность эозинофилов в отношении *Escherichia coli* и *Staphilococcus aureus in vitro*.

В современной литературе имеются также публикации, посвященные изучению роли эозинофилов в противовирусном иммунитете. В частности эозинофилы и продукты их дегрануляции были обнаружены в бронхоальвеолярных смывах, полученных у детей, инфицированных респираторно-синцитиальным вирусом (*hRSV*). J.B. Domachowske et al. [1998] установили, что эозинофилы человека инициируют сокращение вирулентности *hRSV* дозозависимым способом посредством эозинофильного катионного протеина и эозинофильного нейротоксина. Кроме того, D.J. Adamko et al. [1999] показали, что эозинофильная пероксидаза ингибировала репликацию РНК-содержащего вируса парагриппа типа 1 у грызунов в аналогичных условиях *in vitro*. Некоторые исследователи рассматривают возможное влияние эозинофилов на течение ВИЧ-инфекции [Simon D., Simon H.-U., 2007].

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что эозинофильные гранулоциты участвуют в патогенезе широкого круга заболеваний и синдромов. Несмотря на большое количество экспериментальных и клинических работ, посвященных обсуждаемой проблеме, до конца неизученным остается вопрос о механизмах пролонгированного пребывания эозинофильных гранулоцитов в крови при многих заболеваниях. Отсутствуют четкие доказательства того, помогают ли

эозинофилы бороться с инфектогеном. Переосмысление физиологической роли эозинофилов, обусловленное установлением новых структурных, функциональных и метаболических особенностей этих клеток, ориентирует исследователей на дальнейшее и более углубленное изучение феномена эозинофилии при различных патологических процессах.

Заключение

Эозинофильная реакция крови может сопровождать многие инфекционные заболевания, в том числе туберкулез легких. Зарубежными исследователями доказано присутствие эозинофильных лейкоцитов в составе гранулемы, образующейся в легочной ткани при внедрении *M. tuberculosis*. При этом специалисты затрудняются однозначно интерпретировать причины и целесообразность возникновения эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции, неясна роль самой клетки в патогенезе данного заболевания.

На сегодняшний день, эозинофилы принято рассматривать в качестве полифункциональных лейкоцитов, обладающих широким арсеналом цитотоксических факторов (гранулярные белки, липидные медиаторы, метаболиты кислорода и азота), фагоцитарными свойствами, иммунорегуляторными потенциями, что наделяет эти клетки колоссальными возможностями для участия в различных процессах макроорганизма. Идентификация новых, ранее неизвестных компонентов гранул эозинофилов, цитокиновых молекул и поверхностных рецепторных структур указывает на то, что эти клетки в полной мере могут быть вовлечены в патогенез инфекционного процесса. За счет широкого спектра агрессивных компонентов гранул эозинофилы могут осуществлять эффективную элиминацию патогена из организма.

В связи с этим, изучение роли эозинофила в противотуберкулезном иммунитете позволит значительно дополнить существующие представления о патогенезе туберкулезной инфекции и ответить на вопрос: способствуют эозинофильные гранулоциты иммунной защите макроорганизма от инфектогена или, напротив, служат дополнительным резервуаром персистенции патогена и являются фактором деструктивных нарушений. Установление целесообразности возникновения и биологического значения эозинофилии при туберкулезе легких позволит обосновать необходимость контроля данной гематологической реакции при патологии.

Глава 2. Материал и методы исследования

2.1. 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 распространенными деструктивными формами впервые выявленного туберкулеза 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). Включение больных в исследование осуществлялось при непосредственном участии заведующей фтизиатрическим отделением №1 О.И. Новосельцевой, врача-фтизиатра Е.П. Степановой, заведующей кафедрой фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России - д-ра мед. наук, доцента О.В. Филинюк.

Диагноз ТЛ устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования органов грудной клетки, результатов микроскопического и бактериологического исследования мокроты. Возбудитель туберкулеза выявлялся методом прямой световой микроскопии мазка мокроты, окрашенного по Цилю-Нильсену, а также методом люминесцентной микроскопии с использованием флуорохромов (аурамина). 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 проводились 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).

Для решения поставленных задач были сформированы две основные группы больных ТЛ в зависимости от количества эозинофилов в периферической крови.

Первую группу составили 102 пациента с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, во вторую группу вошли 115 больных ТЛ без эозинофилии. Внутри каждой группы были сформированы подгруппы больных с инфильтративным (132 человек) и диссеминированным (85 человек) ТЛ.

Инфильтративный ТЛ (ИТЛ) был диагностирован у 132 (60,8 %) пациентов и характеризовался на рентгенограмме наличием одной или нескольких неоднородных теней туберкулезного инфильтрата диаметром от 3 до 6 см с очагами распада и обсеменения.

Диссеминированный ТЛ (ДТЛ) был выявлен у 85 (39,2 %) больного, рентгенологическим признаком которого являлось наличие в одном или обоих легких мелких и среднеочаговых изменений неоднородной структуры за счет инфильтрации и распада.

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).

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

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

Критериями исключения больных ТЛ из исследования служили возраст менее 18 или более 55 лет, проведение вакцинации (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), 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.

В связи с запланированным дизайном исследования оценка ассоциаций носительства отдельных полиморфизмов генов с изменением цитокинопродукции и экспрессии рецепторов на мембране клеток *in vitro* проводилась на примере двух общих групп больных туберкулезом легких с эозинофилией и без эозинофилии.

Таблица 3

Распределение больных туберкулезом легких по группам исследования

Принципы деления 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.

Оценку функциональной активности эозинофильных гранулоцитов и роли эозинофилии в патогенезе туберкулезной инфекции осуществляли у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией и без таковой с учетом формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП. Среди больных ТЛ, сопровождающимся 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, сопровождающимся 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. 3).

Учитывая то, что эозинофильная реакция крови может сопровождать аллергические заболевания и паразитарные инвазии, в ходе настоящего

исследования у здоровых доноров и больных ТЛ проводились дополнительные диагностические мероприятия (сбор анамнестических данных, изучение «рыбного» анамнеза, иммуноферментный анализ (ИФА) с целью выявления диагностически значимых титров антител к антигенам гельминтов, копроовоскопическое исследование).

Все обследованные лица отрицали наличие в анамнезе аллергических заболеваний, отягощенной наследственности, лекарственной и пищевой аллергии. При проведении иммуноферментного анализа у здоровых доноров диагностически значимых титров антител (иммуноглобулинов класса G) к антигенам описторхисов, лямблий, трихинелл, токсокар и эхинококков в сыворотке крови выявлено не было. Среди пациентов с ТЛ отрицательные значения результатов иммуноферментного анализа ко всем гельминтам были зарегистрированы у 77 % пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и у 89 % больных ТЛ без эозинофилии. При этом у 23 % больных ТЛ с эозинофилией и 11 % больных ТЛ без эозинофилии были зарегистрированы положительные результаты ИФА к антигенам *Opisthorchis felineus*, однако клинических и анамнестических признаков описторхоза выявлено не было. Лишь у 3 пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, выявлялись симптомы гастродуоденальной диспепсии (тошнота, чувство давления в эпигастральной области, изжога, отрыжка) и признаки ангиохолецистита.

В связи с отягощенным эпидемиологическим анамнезом (пребывание большинства больных ТЛ в местности, неблагополучной по описторхозу; употребление необезвреженной рыбы семейства карповых) с целью исключения диагноза описторхоза пациентам с ТЛ проводилось копроовоскопическое исследование на базе бактериологической лаборатории Томской областной туберкулезной клинической больницы.

Результаты исследований молекулярно-генетических механизмов эозинофилии крови при ТЛ, показателей структурно-функционального статуса эозинофилов и параметров клинко-рентгенологического и иммунологического обследования пациентов подвергали статистическому анализу только у больных ТЛ с неотягощенным аллергологическим анамнезом и отсутствием признаков

описторхоза, подтвержденного клиническими, иммунологическими и копроовоскопическими методами исследования.

2.2. Материал исследования

Материалом исследования являлась венозная кровь, взятая у здоровых доноров и 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 лаборатории экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и Центральной научно-исследовательской лаборатории (зав. – д-р мед. наук, профессор А.Н. Байков).

2.3. Методы исследования

Распределение здоровых доноров и больных ТЛ по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в табл.4.

Таблица 4

Распределение обследованных лиц в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Больные ТЛ с эозинофилией	Больные ТЛ без эозинофилии
1	2	3	4
Определение общего количества лейкоцитов, абсолютного и относительного содержания эозинофилов и лимфоцитов в крови	46	102	115
Определение содержания IL-5, CCL11, IFN γ , суммарного пула противотуберкулезных антител в плазме крови методом иммуноферментного анализа	27	34	30

Продолжение табл. 4

1	2	3	4
Определение содержания эозинофильных гранулоцитов, экспрессирующих IL-5RA и CCR3, (в интактной культуре и при индукции гIL-5) методом проточной цитометрии	19	27	24
Исследование полиморфизма генов <i>IL5</i> , <i>CCL11</i> и <i>IL5RA</i> , <i>CCR3</i> методом рестрикционного анализа продуктов амплификации специфических участков генома	120	102	115
Определение содержания эозинофильных гранулоцитов, экспрессирующих молекулы адгезии (CD9, CD18), методом проточной цитометрии	21	24	29
Исследование секреции эозинофильными гранулоцитами IL-2, IL-5, TNF α <i>in vitro</i> (базальной и при индукции BCG) методом иммуноферментного анализа	14	17	18
Определение фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов методом проточной цитометрии	20	24	19
Определение активности пероксидазы эозинофильных гранулоцитов методом спектрофотометрии	12	19	17
Определение количества лимфоцитов крови, экспрессирующих поверхностные молекулы CD3 и CD20 иммунофлуоресцентным методом	24	21	23

Продолжение табл. 4

1	2	3	4
Исследование секреции мононуклеарными лейкоцитами IL-2, IL-4, IL-10, TGFβ <i>in vitro</i> (базальной и при индукции BCG) методом иммуноферментного анализа	32	17	28
Определение содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих в комплексе поверхностные молекулы CD4, CD25 и внутриклеточный транскрипционный фактор Foxp3 методом проточной цитометрии	18	12	16

2.3.1. Определение общего количества лейкоцитов в периферической крови

Определение общего количества лейкоцитов проводили стандартным методом [Меньшиков В.В., 2011].

Принцип метода. Подсчет лейкоцитов под микроскопом в определенном количестве квадратов счетной сетки и пересчет на 1 л по системе СИ, исходя из объема квадратов (1/250 мкл) и разведения (в 20 раз).

Ход работы. Для подсчета лейкоцитов исследуемую кровь разводили в 20 раз: в пробирку наливали 0,4 мл 3-5 % раствора уксусной кислоты и выдували 0,02 мл крови, перемешивали. Полученной смесью заполняли камеру Горяева и помещали на столик микроскопа. Подсчет вели в 100 больших квадратах. Расчет числа лейкоцитов проводили по формуле:

$$X = (a \times 20 \times 250) / 100 \times 10^6 / \text{л} = a / 20 \times 10^9 / \text{л} \quad (1),$$

где X – количество лейкоцитов в 1 литре крови, а – сумма лейкоцитов, подсчитанных в 100 больших квадратах.

Результаты выражали в абсолютных числах ($\times 10^9/\text{л}$).

2.3.2. Подсчёт лейкоцитарной формулы

Подсчёт лейкоцитарной формулы проводили стандартным методом [Меньшиков В.В., 2011].

Принцип метода. Микроскопия сухих фиксированных и окрашенных мазков крови с дифференциальным подсчетом различных форм лейкоцитов.

Ход работы. Мазки, приготовленные из периферической крови, фиксировали в 96 % метиловом спирте в течение 3 мин. Окрашивали по методу Нохта (состав краски: 6 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,1 % раствора азура II, 0,5 мл 0,1 % раствора эозина) в течение 30 мин, промывали в проточной воде, высушивали, микроскопировали. Подсчитывали 100 лейкоцитов, дифференцируя отдельные морфологические формы клеток.

Результаты выражали в процентах и абсолютных числах ($\times 10^9/\text{л}$).

2.3.3. Выделение и культивирование эозинофильных гранулоцитов периферической крови

Выделение эозинофильных гранулоцитов из цельной крови проводили по методу, описанному I. Gartner [1980].

Принцип метода. Оседание эозинофилов происходит в соответствии с их плотностью в определенном градиенте. В работе использовали ступенчатый градиент Percoll ($\rho=1,133 \text{ г/см}^3$) («SigmaLifeScience», США).

Приготовление градиента различной плотности проводили по формуле:

$$X = V \times P - 0,106 - 0,9 / P_0 - 0,13 \quad (2),$$

где X – требуемое количество Percoll (мл), V – требуемое количество раствора (10 мл), P – требуемая плотность раствора, P_0 – исходная плотность раствора ($1,133 \text{ г/см}^3$) (табл. 5).

Ход работы:

Выделение эозинофильных гранулоцитов из цельной крови. Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) в количестве 20 мл осаждали раствором декстрана (в 0,9 % NaCl) в соотношении 4:1 с целью удаления эритроцитов. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 45-60 мин. Надосадок наслаивали на градиент плотности Percoll ($\rho=1,081 \text{ г/см}^3$) и

центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Полученные эозинофильные кольца собирали автоматической пипеткой с раздела фаз и дважды отмывали раствором 0,9 % NaCl, последовательно ресуспендируя и центрифугируя в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из осадка клеток, полученного с градиента, готовили мазок и окрашивали азуром II-эозином с последующим подсчетом 100 клеток и определением относительного содержания эозинофилов. Подсчет количества эозинофилов проводили общепринятыми гематологическими методами [Меньшиков В.В., 2011]. При использовании градиента указанной плотности 87 % выделенных лейкоцитов составляли эозинофильные гранулоциты.

Таблица 5

Приготовление градиентов Percoll разной плотности

Требуемая плотность Percoll, г/см ³	Раствор Percoll (ρ ₀ =1,133 г/см ³), мл	0,2 М раствор NaCl, мл	Дистиллированная вода, мл
1,105	7,60	1	1,40
1,095	6,80	1	2,20
1,090	6,46	1	2,54
1,081	6,07	1	2,93
1,070	5,46	1	3,54

Культивирование эозинофильных гранулоцитов. Выделенные эозинофильные гранулоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90 % RPMI-1640, 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина. Стандартизировали количество клеток в суспензии до 1×10^6 /мл и исследовали их на жизнеспособность. Для этого 0,1 мл суспензии смешивали с равным объемом 0,5 % трипанового синего («Serva» США) и заполняли счетную камеру Горяева. Жизнеспособность эозинофильных лейкоцитов оценивали, вычитая число «мертвых» клеток, окрашенных в синий цвет. Для стимуляции экспрессии рецепторного аппарата эозинофильных клеток в часть проб добавляли 10 мкг/мл рекомбинантного (r) IL-5 («Biosource», Бельгия). Клеточные суспензии в количестве 1 мл инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, осадок использовали для оценки презентации

мембраносвязанных форм цитокиновых рецепторов с помощью метода лазерной проточной цитофлуориметрии. Для стимуляции цитокинпродуцирующей активности эозинофилов в пробы вносили вакцинный штамм BCG в дозе 20 мкг/мл (ФГУП «НПО Микроген»). Клеточные суспензии в количестве 1 мл инкубировали при 37°C в течение 24 ч. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, супернатант собирали и использовали для количественного определения концентраций цитокинов.

2.3.4. Выделение и культивирование мононуклеарных лейкоцитов периферической крови

Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови проводили по методу А. Воум [1968].

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из цельной крови. Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) выдерживали при 37 °С в течение 30 мин для отделения эритроцитов. Полученную богатую лейкоцитами взвесь наслаивали на LSM ® (lymphocyte separation medium) - градиент плотности Ficoll-diatrizoate ($\rho=1,077$ г/мл) («MP Biomedical, LLC», США) в соотношении 1:2 и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 40 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали пипеткой, трижды отмывали средой RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), дополненной 100 мкг/мл гентамицина и 5 % инактивированной эмбриональной телячьей сывороткой (ООО «БиолоТ», Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 об/мин. При использовании градиента указанной плотности 90 - 95 % от всех выделенных мононуклеаров составляли лимфоциты.

Приготовление супернатантов. Для получения супернатантов выделенные мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90 % RPMI-1640 (ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия), 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ООО «БиолоТ», Россия), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина. Стандартизировали количество клеток в суспензии до $2,5 \times 10^6$ /мл. Для индукции секреторной функции

мононуклеарных лейкоцитов в пробы вносили вакцинный штамм BCG в дозе 50 мкг/мл (ФГУП «НПО Микроген»). В контрольные пробы вносили полную питательную среду. Клеточные суспензии в количестве 1 мл инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин. Супернатанты собирали и использовали для количественного определения цитокинов с применением иммуноферментного анализа. Клетки осадка исследовали на жизнеспособность (п. 2.3.3).

2.3.5. Определение содержания цитокинов в крови и супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов и мононуклеарных лейкоцитов

Для определения содержания IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN γ , TNF α , TGF β и CCL11 в плазме крови и супернатантах культуральных суспензий использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA).

Принцип метода заключается в конъюгации одного эпитопа молекулы цитокина с мышинными моноклональными антителами, сорбированными на твердой фазе микропланшета. Другой тип антител – кроличьи поликлональные специфичные против человеческих цитокинов антитела соединяются с независимым эпитопом цитокина. Избыток кроличьих антител удаляется. К сорбированным на твердой фазе комплексам «цитокин-антитело» добавляется окрашивающий раствор. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически. Калибровочная кривая строится с использованием среды, не содержащей продукты жизнедеятельности клеток («0 доза») и стандартных растворов цитокинов с известной концентрацией.

Ход работы. Процедуру ИФА проводили, согласно инструкциям, предлагаемым отечественными (ЗАО «Вектор-Бест», ООО «Протеиновый контур», Россия) и зарубежными («Biosource», США, «Bender Medsystems» США, «BSM Diagnostics», США) производителями тест-систем. Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокина вычисляли по калибровочной кривой, результаты выражали в пг/мл.

2.3.6. Определение мембраносвязанных форм цитокиновых рецепторов на эозинофильных гранулоцитах крови

Для определения уровня экспрессии рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксинам (CCR3) в интактной и стимулированной в условиях инкубации с рекомбинантным (r) IL-5 культуральных суспензиях эозинофильных гранулоцитов крови применяли метод проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флюоресцентной меткой FITC (Fluorescein isothiocyanat).

Принцип метода состоит в двустадийной процедуре окрашивания антигенположительных клеток. На первой стадии происходит специфическое связывание немеченых моноклональных антител с соответствующими поверхностными антигенами клеток периферической крови. Вторая стадия - «проявление» реакции: в эозинофилах, нагруженных моноклональными антителами, при добавлении вторых антител, меченных FITC (зеленый), регистрируют показатель флуоресценции.

Процедуру окрашивания поверхностных рецепторов проводили согласно протоколам фирм-производителей («R&D Systems», США и «Caltag Laboratories», США).

Ход работы. После культивирования клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (pH=7,4) и стандартизировали количество клеток в суспензии до 1×10^6 /мл. Для определения уровня экспрессии IL-5R и CCR3 к культуре эозинофильных гранулоцитов добавляли 10 мкл соответствующих биотинилированных антител («R&D Systems», США) (в случае эотаксина дополнительно ставили пробы с негативным контролем) и инкубировали 45-60 мин при 2-8 °С. Затем в каждую пробирку добавляли по 10 мкл МКАТ FITC (Fluorescein isothiocyanat) - меченых к CCR3 («R&D Systems», США) и IL-5R («Caltag Laboratories», США). Инкубировали в течение 30 мин при 2-8 °С в темном месте. Дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (pH=7,4), ресуспендировали клетки в 400 мкл буфера.

Измерение производили на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили по трем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и показателю флуоресценции – зеленому (FITC – 530 нм), выявляемому на FL1-канале (рис. 1).

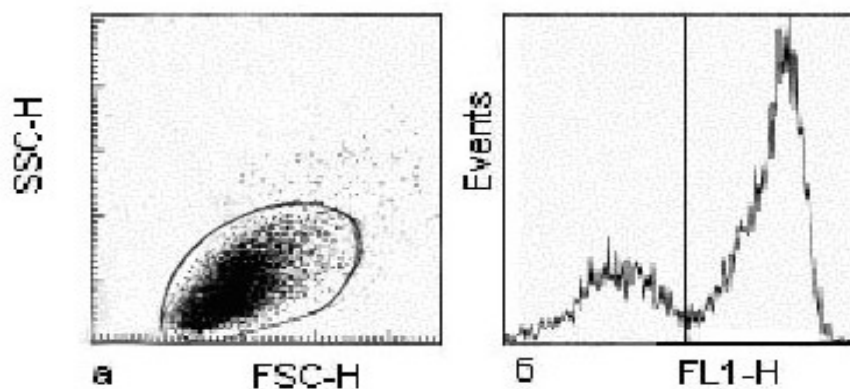


Рис. 1. Гистограмма распределения эозинофильных лейкоцитов по интенсивности флуоресценции в FL1-канале. Регистрируется количество IL-5RA⁺ клеток, меченных FITC, в гейте эозинофильных гранулоцитов:

а – принцип автоматического выделения гейта эозинофилов по показателям малоуглового (FS) и бокового (SS) светорассеивания;

б – одномерная гистограмма интенсивности флуоресценции в гейте эозинофильных клеток по FL1-каналу (слева от оси – несветящиеся клетки, справа – FITC-положительные эозинофилы).

Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

2.3.7. Выделение ДНК

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

Принцип метода. ДНК осаждается на сорбент, затем отмывается буферным раствором и сорбент удаляется. Полученная ДНК используется для дальнейших исследований.

Ход работы. Перед началом работы лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 прогревали при 65 °С до полного растворения кристаллов. Отбирали необходимое количество одноразовых пробирок. Вносили в каждую пробирку по 300 мкл лизирующего раствора и по 100 мкл венозной крови. Пробы тщательно перемешивали на вортексе и прогревали при 65 °С. Центрифугировали 5 с при 5000 об/мин на микроцентрифуге (при неполном растворении пробы центрифугировали пробирки 5 мин при максимальных оборотах на микроцентрифуге). Для выделения ДНК использовали надосадочную жидкость. Тщательно ресуспендировали сорбент на вортексе и добавляли в каждую пробирку отдельным наконечником по 25 мкл ресуспендированного сорбента. Пробы перемешивали на вортексе, ставили в штатив на 2 мин, затем ещё раз перемешивали и оставляли в штативе на 5 мин. Осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 5000 об/мин в течение 30 с. Удаляли супернатант в колбу-ловушку, используя вакуумный отсасыватель и отдельный наконечник для каждой пробы. Далее пробы отмывали один раз раствором для отмывки №1 и два раза раствором для отмывки №2. Затем пробирки с открытыми крышками помещали в термостат при 65 °С на 5-10 мин для подсушивания сорбента, после чего в пробирки добавляли по 50 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК, перемешивали на вортексе и ставили в термостат при 65 °С на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге при 12000 об/мин в течение 1 мин. Полученный супернатант содержал очищенную ДНК.

2.3.8. Исследование аллельного полиморфизма генов цитокинов и их рецепторов

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

Принцип метода. Исследуемые аллельные варианты генов относятся к SNP-полиморфизмам, т.е. характеризуются заменой одного нуклеотида. Для детекции использовалась специфическая эндонуклеаза рестрикции. По наличию или отсутствию рестрикции делают заключение о характере полиморфизма.

Ход работы. Амплификацию осуществляли, согласно инструкции, прилагаемой к набору «АмплиСенс РСР» («ИнтерЛабСервис», Россия), в пробирках типа «Эппендорф» путем ПЦР, используя структуру праймеров и параметры температурных циклов, описанных в литературе и учитывая применение амплификатора «Терцик МС2» («ДНК-технология», Россия). Общая реакционная смесь для амплификации объемом 15 мкл содержала:

- 1,0 мкМ специфических праймеров;
- 0,5 мкл 10× dNTP-mix;
- 8 мкл ПЦР-смеси-2-red с конечной концентрацией Mg^{2+} 2,2 мМ;
- 2,5 мкл стерильной воды;
- 2 мкл исследуемой ДНК (из расчета на одну пробу).

Сверху наносили по 1 капле масла для ПЦР.

Программа амплификации включала в себя предварительную денатурацию при 95 °С в течение 7 мин с последующими 30-35 циклами отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (35 с), элонгацию цепи при 72 °С (35 с) и денатурацию при 94 °С (35 с). Программу завершала финальная элонгация при 72 °С в течение 3 мин. Амплификат подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой при оптимальной для фермента температуре в течение 12 ч (табл. 6).

Анализ продуктов гидролиза ПДРФ-анализа проводили разделением фрагментов ДНК в 2 % агарозном геле: 2 г агарозы смешивали с 2 мл 50×ТАЕ буфера (242 г трисаминометана, 37,2 г ЭДТА, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, доводили до 1 л H_2O , рН=8,0) и нагревали в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. Охлаждали раствор до 50-60 °С и заливали в камеру для электрофореза, в которой предварительно устанавливали гребенку для формирования лунок.

Для формирования геля оставляли его на 20-30 мин, затем камеру заполняли 1×ТАЕ буфером (10 мл 50×ТАЕ буфера, 490 мл H_2O) так, чтобы он слегка покрывал гель и убирали гребенку. После проведения ПДРФ-анализа 5 мкл продукта рестрикции разделяли в агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромида, при напряжении 150 В в течение 30-45 мин для последующей

визуализации в ультрафиолетовом свете. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду *pUC19*, расщепленную рестриктазой *MspI* («Сибэнзим», Россия).

Таблица 6

Характеристика исследованных полиморфизмов генов

Ген, полиморфный сайт	Структура праймеров 5'→3'	Температура отжига праймеров (°C)	Фермент рестрикции	Ссылка
<i>IL5</i> С-703Т	F : cag-gga-gag-cca-atc-agt R : atg-atg-tcc-aga-ctc-cag-gat-ct	60	<i>Alw NI</i>	[Фрейдин М.Б., 2002]
<i>IL-5RA</i> G-80А	F : at-ggc-tat-ctg-gac- gag-ag R : tta-gag-gcg-gtt-ctt-cac- tc	57	<i>Acs I</i>	[Фрейдин М.Б., 2002]
<i>Eotaxin 1</i> А-384G	F : ggt-ttc-ctt-gct-cct-ttc-ctc R : gca-gaa-cag-aag-aga-ggc-aa	58	<i>TaqI</i>	[Tsunemi Y., 2002]
<i>CCR3</i> Т-51С	F : ctt-tgg-tac-cac-atc-cta-cca R : tga-gag-gag-ctt-aca-cat-gc	55	<i>Nla III</i>	[Fukunaga K., 2001]

2.3.9. Определение количества CD9⁺ и CD18⁺ эозинофилов в периферической крови

Для определения экспрессии CD9 и CD18 на мембране эозинофильных гранулоцитов периферической крови применяли метод проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками.

Принцип метода состоит в процедуре окрашивания антигенположительных клеток. Происходит специфическое связывание моноклональных антител, меченных FITC (Fluorescein isothiocyanat) и PE (Phicoeretin), с соответствующими поверхностными антигенами клеток периферической крови, после чего регистрируется показатель флуоресценции.

Процедуру окрашивания CD9- и CD18-маркеров проводили согласно протоколу фирмы производителя («Caltag Laboratories», США).

Ход работы. После выделения эозинофильные гранулоциты дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (рН=7,4) и стандартизировали количество клеток в суспензии до 1×10^6 /мл. Для определения уровня экспрессии CD9 и CD18 к культуре эозинофильных гранулоцитов добавляли 20 мкл МКАТ FITC- и PE-

меченых («Caltag Laboratories», США) соответственно. Пробы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темном месте. Дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (РН=7,4), ресуспендировали клетки в 400 мкл буфера.

Измерение производили на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили по трем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (SSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и показателям флуоресценции – зеленому (FITC – 530 нм) для CD9 или оранжевому (PE – 585 нм) для CD18, выявляемых на FL1- и FL2-каналах. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X. Результаты выражали в процентах.

2.3.10. Определение фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов

Для определения фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов периферической крови применяли метод проточной цитометрии с использованием стабилизированной и опсонизированной суспензии *E. coli*, меченной флуоресцентной меткой FITC.

Принцип метода заключается в цитометрическом определении количества фагоцитирующих клеток, поглотивших *E. coli*, меченных флуоресцентной меткой FITC.

Постановку фагоцитоза осуществляли согласно инструкции, прилагаемой производителем тест-системы PHAGOTEST («Glycotope Biotechnology GmbH», Германия).

Ход работы. Выделенные эозинофильные гранулоциты дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (РН=7,4), стандартизировали количество клеток в суспензии до 1×10^6 /мл и инкубировали на льду в течение 10 мин (необходимо охладить клетки до 0 °С). Далее к культуре эозинофильных гранулоцитов добавляли 20 мкл стабилизированной и опсонизированной суспензии охлажденных

бактерий *E.coli*, меченных FITC, встряхивали и инкубировали 10 мин при температуре 37 °C на водяной бане, контрольные пробы оставляли на льду. Непосредственно перед окончанием инкубации все образцы из водяной бани одновременно перемещали на лед для остановки фагоцитоза. Затем в каждую пробирку добавляли по 100 мкл охлажденного подавляющего раствора (QUENCHING SOLUTION) для ингибирования флуоресценции бактерий, прикрепленных к поверхности клеток, пробирки встряхивали. Клетки дважды отмывали WASHING SOLUTION, добавляя во все пробирки по 3 мл отмывочного раствора с последующим центрифугированием (5 мин при 1500 об/мин при +4 °C). Затем во все пробирки вносили по 2 мл предварительно нагретого (до комнатной температуры) лизирующего раствора (LYSING SOLUTION) и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Далее производили однократную отмывку клеток (5 мин при 1500 об/мин при +4 °C). Затем в каждую пробирку добавляли по 20 мкл раствора для окрашивания ДНК (DNA STAINING SOLUTION) с целью исключения бактерий и инкубировали 10 мин на льду, предохраняя от попадания света.

Измерение производили на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

Для определения процента фагоцитирующих эозинофилов использовали контрольную пробу для установления маркера флуоресценции FL1. Процент фагоцитирующих клеток в исследуемом образце определяли путем вычисления количества событий, выходящих за границу данного маркера флуоресценции. Значение флуоресценции коррелировало с количеством бактерий на один лейкоцит.

2.3.11. Определение активности пероксидазы эозинофильных гранулоцитов

Определение активности эозинофильной пероксидазы производили по методу, предложенному E. Sato в модификации D. Quaglino [1967].

Принцип метода. Определение скорости реакции окисления бензидина перекисью водорода при участии фермента (пероксидазы) с образованием окрашенного продукта реакции.

Ход работы. Готовили лизат предварительно выделенных эозинофильных гранулоцитов (п. 2.3.3) путем добавления 150 мкл 20 % уксусной кислоты к равному объему клеточной суспензии. Далее в термостатированную кювету с ходом луча 10 мм вносили 4 мл 2,5 мМ раствора бензидина и 1 мл 0,6 % раствора перекиси водорода, предварительно прогретых до 37 °С, перемешивали содержимое кюветы. Затем в кювету добавляли 100 мкл лизата эозинофилов, включали секундомер, перемешивали и ровно через 5 мин регистрировали на спектрофотометре «Unico 2800» показания оптической плотности опытной пробы при длине волны 520 нм против контрольной пробы, содержащей 100 мкл дистиллированной воды вместо лизата.

Активность пероксидазы в клетках выражали в мккат/г белка эозинофилов, относя полученную по формуле величину А (мккат/л) к концентрации белка в лизате клеток (г/л), определяемую микробиуретовым методом (п. 2.3.11.1).

Расчет активности пероксидазы производили по формуле:

$$A = (E_0 - E_k) \times V_1 / V_2 \times 300 \times \varepsilon \quad (3),$$

где:

А – активность фермента в реакционной смеси (мккат/л);

E_0 – оптическая плотность опытной пробы;

E_k – оптическая плотность контрольной пробы;

V_1 – конечный объем пробы в кювете (5,2 мл);

V_2 – объем исследуемого материала (0,1 мл);

300 – время проведения реакции, сек;

ε - коэффициент молярной экстинкции продукта реакции (17,65 л/моль×см).

2.3.11.1. Определение белка микробиуретовым методом

Принцип метода. Метод основан на появлении фиолетового окрашивания при добавлении щелочного раствора меди к раствору белка, при этом развитие окраски обусловлено наличием пептидных связей в белке.

Ход работы. К 100 мкл лизата эозинофильных гранулоцитов добавляли 3,5 мл 3 % NaOH и 200 мкл реактива Бенедикта (17,3 г цитрата натрия, 10 г углекислого натрия, 1,73 сульфата меди, растворенные в 100 мл воды при нагревании). Смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Интенсивность развившейся окраски определяли фотометрически при длине волны 330 нм против холостой пробы (100 мкл дистиллированной воды, 4 мл NaOH и 200 мкл реактива Бенедикта). Содержание белка в пробах рассчитывали по калибровочной кривой, используя разведения стандартного раствора белка с концентрацией 50 г/л. Результат выражали в г/л.

2.3.12. Определение CD3⁺ и CD20⁺ лимфоцитов в периферической крови

Определение дифференцировочных антигенов лимфоцитов (CD-маркеров) человека проводили методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием наборов моноклональных антител (МКАТ) (ООО «Сорбент», Россия).

Принцип метода заключается в двустадийной процедуре иммунофлуоресцентного окрашивания антигенположительных клеток. На первой стадии происходит специфическое связывание МКАТ с соответствующими поверхностными антигенами клеток периферической крови. Вторая стадия – «проявление» реакции окрашиванием связавшихся антител флуоресцеина изотиоцианат-конъюгатом (FITC).

Ход работы. На предметные стекла наносили клеточную суспензию (п. 2.3.4) в количестве 25 мкл, предварительно стандартизовав количество клеток до $2,5 \times 10^6$ /мл, и инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре во влажной камере. Осевшие клетки фиксировали в холодном ацетоне (8-10 мин), после чего наносили 15 мкл разведенных МКАТ (5 мкл МКАТ + 10 мкл раствора Хэнкса с 2 % эмбриональной телячьей сывороткой). Инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере. В качестве отрицательного контроля использовали препараты, подготовленные аналогичным образом с добавлением раствора Хэнкса. Однократно отмывали препараты раствором Хэнкса. Затем добавляли 15 мкл (разведение в 100 раз физиологическим раствором) FITC-меченных антител и инкубировали в течение 40 мин при 4⁰С, после чего отмывали

1 мл раствора Хэнкса. Подсчёт клеток проводили с помощью люминесцентного микроскопа («Micros MC 400S», Австрия), предварительно добавляя на стекла 15 мкл глицероля. Подсчитывали 100 лимфоцитов, дифференцируя среди них флуоресцирующие. Результаты выражали в процентах (к 100 подсчитанным клеткам) и абсолютных числах (от общего количества лимфоцитов в крови, $\times 10^9/\text{л}$).

2.3.13. Определение содержания $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$ и $\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{Foxp3}^+$ регуляторных Т-клеток в периферической крови

Для определения поверхностных структур CD4, CD25 и внутриклеточного маркера иммуносупрессорной активности Foxp3 в лимфоцитах периферической крови применяли метод проточной лазерной трехцветной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ), меченных флуоресцентными метками.

Процедуру окрашивания поверхностных (CD4, CD25) и внутриклеточного (Foxp3) маркеров проводили согласно протоколу фирмы производителя («Becton Dickinson (BD)», США).

Ход работы. Выделенные мононуклеарные лейкоциты дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (pH=7,4) и стандартизировали количество клеток в суспензии до $1 \times 10^6/\text{мл}$. Для окрашивания поверхностных маркеров (CD4, CD25) лимфоцитов к суспензии мононуклеарных лейкоцитов добавляли 20 мкл соответствующих специфических МКАТ, меченных флуоресцентными метками: МКАТ к CD4, меченные FITC, и МКАТ к CD25, меченные PE-Cy5 («Becton Dickinson», США). Пробы инкубировали 20 мин при комнатной температуре, в темном месте.

Для идентификации внутриклеточного маркера Foxp3 проводили пермеабиллизацию лимфоцитов. Для этого в каждую пробирку поочередно приливали рабочие растворы стандартных буферов: Human Foxp3 Buffer A и Human Foxp3 Buffer C (BD Pharmingen Human Foxp3 Buffer Set). Буферы разводили согласно инструкции, прилагаемой производителем. Лейкоциты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре без света. Затем клетки дважды отмывали 2 мл фосфатно-солевого буфера (pH =7,4). В ресуспендированный осадок

вносили 20 мкл антител к внутриклеточному маркеру Foxp3, меченных PE, и инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (pH=7,4), к осадку добавляли 400 мкл фосфатно-солевого буфера, после чего пробы были готовы к измерению.

Измерение производили на цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD CellQuest for Mac OS® X.

2.3.14. Определение концентрации суммарных антител к антигенам *Mycobacterium tuberculosis* в крови

Принцип метода заключается в конъюгации одного эпитопа молекул иммуноглобулинов А, М, G человека с антигенами микобактерии, сорбированными на твердой фазе микропланшета. Другой тип антител - кроличьи поликлональные, специфичные против антител к возбудителю туберкулеза, соединяются с независимыми эпитопами иммуноглобулинов. Избыток кроличьих антител удаляется. К сорбированным на твердой фазе комплексам «иммуноглобулин-антитело» добавляется окрашивающий раствор. Оптическая плотность раствора пропорциональна концентрации антител в исследуемых образцах и регистрируется колориметрически.

Ход работы. Процедуру ИФА проводили согласно инструкции, предлагаемой производителем тест-системы ЗАО «Вектор-Бест». Оптическую плотность содержимого ячеек планшета регистрировали на фотометре Multiscan EX (Финляндия) при длине волны 450 нм. Исследуемый образец расценивали как положительный, если среднее значение его оптической плотности (ОП) было больше $(ОП_{\text{сред.К-}}) \times 1,4 + 0,15$. Если средние значения ОП исследуемого образца были меньше $(ОП_{\text{сред.К-}}) \times 1,2 + 0,09$, то результат считали отрицательным. Если значения $ОП_{\text{сред}}$ исследуемого образца находились между этими значениями, то результат считали сомнительным. Сомнительные сыворотки анализировали повторно. При аналогичном результате сыворотки считали положительными.

2.4. Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 10.0. Количественные показатели представляли в виде $\bar{X} \pm m$, где \bar{X} - среднее арифметическое, m - стандартная ошибка среднего; Me (Q₁- Q₃), где Me - медиана, Q₁ - первый квартиль, Q₃ - третий квартиль. Для показателей, характеризующих качественные признаки, вычисляли W - выборочные доли и S_w - среднюю ошибку выборки для доли, выраженную в %. Проверку гипотезы о равенстве долей в двух исследуемых выборках проводили методом угловой трансформации, основанной на преобразовании Фишера. Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с применением критерия Шапиро-Уилка W. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали U-критерий Манна-Уитни для независимых групп. С целью выявления функциональных взаимосвязей между группами изучаемых количественных параметров применяли корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Оценку взаимосвязи качественных признаков проводили с использованием бисериального коэффициента корреляции и коэффициента ассоциации. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p \leq 0,05$ [Лакин Г.Ф., 1980; Боровиков В., 2001].

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:

$$OR=(A \times D)/(B \times C) \quad (4),$$

где: A – количество больных туберкулезом, имеющих генотип (аллель);

B – количество больных туберкулезом, не имеющих генотип (аллель);

C – количество здоровых доноров, имеющих генотип (аллель);

D – количество здоровых доноров, не имеющих генотип (аллель).

При $OR=1$ судили об отсутствии связи между сравниваемыми факторами (признаками), при $OR<1$ – об отрицательной связи и, при $OR>1$ – о положительной связи признаков [Флейс Дж., 1989].

Глава 3. Результаты исследования

В рамках запланированного исследования все обследованные пациенты с туберкулезом легких (ТЛ) были разделены на две группы в зависимости от содержания эозинофилов в периферической крови. Первую группу обследованных лиц составили больные ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, в крови которых абсолютное и относительное количество эозинофилов оказалось равным $(0,966 \pm 0,110) \times 10^9/\text{л}$ и $(8,790 \pm 0,250)\%$, что достоверно превышало аналогичные показатели у здоровых доноров ($(0,196 \pm 0,010) \times 10^9/\text{л}$ и $3,530 \pm 1,300\%$). Во вторую группу обследованных вошли пациенты с ТЛ без эозинофилии (количество эозинофилов в периферической крови соответствовало $(0,249 \pm 0,010) \times 10^9/\text{л}$ и $2,572 \pm 1,190\%$).

Таблица 7

Содержание эозинофильных гранулоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц		Содержание эозинофилов	
		%	$\times 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры		$3,530 \pm 1,300$	$0,196 \pm 0,010$
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	$7,960 \pm 0,380$ $p_1 < 0,05$	$0,791 \pm 0,120$ $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	$9,780 \pm 1,030$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$1,140 \pm 0,011$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	$3,000 \pm 1,050$ $p_2 < 0,05$	$0,294 \pm 0,010$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	$2,167 \pm 1,618$ $p_2 < 0,05$	$0,222 \pm 0,001$ $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл.9: 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.

Далее внутри каждой группы пациентов были выделены подгруппы с инфильтративным (ИТЛ) и диссеминированным (ДТЛ) туберкулезом легких.

Среди больных ТЛ с эозинофилией максимальные значения абсолютного числа эозинофилов были зарегистрированы у больных с диссеминированным вариантом течения туберкулезной инфекции (в 5,8 раза выше нормы и в 1,4 раза выше, чем при инфильтративном ТЛ, $p_1, p_3 < 0,05$) (табл. 7).

Таблица 8

Содержание эозинофилов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц			Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		%	3,53±1,30	
		×10 ⁹ /л	0,196±0,010	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	%	8,570±1,471 $p_1 < 0,05$	7,000±1,030 $p_1 < 0,05$
		×10 ⁹ /л	0,933±0,024 $p_1 < 0,05$	0,829±0,020 $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	%	8,430±0,981 $p_1 < 0,05$	9,550±2,010 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
		×10 ⁹ /л	1,011±0,010 $p_1 < 0,05$	0,984±0,016 $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	%	2,650±1,070 $p_2 < 0,05$	1,750±1,031 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
		×10 ⁹ /л	0,264±0,047 $p_2 < 0,05$	0,136±0,032 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	%	2,270±0,986 $p_2 < 0,05$	2,500±1,100 $p_2 < 0,05$
		×10 ⁹ /л	0,245±0,026 $p_2 < 0,05$	0,239±0,021 $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 10, 11: 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 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

Разделение пациентов с ТЛ в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (ПТП) показало, что наиболее

выраженная эозинофилия отмечалась при лекарственно-устойчивом варианте диссеминированного туберкулеза легких (ЛУ ДТЛ) ($p_4 < 0,05$) (табл. 8).

3.1. Содержание IL-5 и CCL11 в крови у больных туберкулезом легких

3.1.1. Содержание IL-5 и CCL11 в крови в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови и формы заболевания

При анализе содержания IL-5 было зарегистрировано увеличение данного показателя у больных ТЛ, в крови которых количество эозинофилов превышало норму (гемическая эозинофилия). Так, уровень IL-5 в крови у больных ИТЛ оказался повышенным в 5,9 раза, а у больных ДТЛ - в 7,1 раза по сравнению с соответствующим показателем в группе здоровых доноров. У пациентов с ТЛ без эозинофилии, как при ИТЛ, так и при ДТЛ, данный показатель не отличался от контрольных значений (табл. 9).

Таблица 9

Содержание IL-5 и CCL11 в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (пг/мл) (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) $p_2 < 0,05$

При сравнении уровня IL-5 в крови у пациентов с туберкулезной инфекцией в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови также были выявлены

статистически значимые различия. Так, у больных ИТЛ с эозинофилией концентрация данного цитокина в крови в 4,9 раза превышала аналогичный параметр у больных ИТЛ без эозинофилии.

Таблица 10

Содержание IL-5 в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		7,99 (7,56-19,44)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инfiltrативный	65,66 (51,43-72,28) $p_1 < 0,05$	64,49 (48,12-69,41) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	54,02 (37,93-62,06) $p_1 < 0,05$	71,52 (56,73-77,32) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инfiltrативный	11,32 (9,40-13,54) $p_2 < 0,05$	9,15 (7,11-10,05) $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	10,94 (7,76-11,49) $p_2 < 0,05$	11,46 (10,06-21,30) $p_2 < 0,05$

При этом у больных ДТЛ, ассоциированным с эозинофильной реакцией крови, концентрация IL-5 оказалась в 7,8 раза выше аналогичного показателя у больных ДТЛ без таковой. Наиболее высокое значение IL-5 в крови было зарегистрировано у пациентов ДТЛ с эозинофилией ($p_3 < 0,05$) (табл. 10). Наряду с этим, установлена положительная корреляционная зависимость между уровнем IL-5 в крови и количеством эозинофильных гранулоцитов при ДТЛ ($r=0,81$, $p < 0,05$).

В ходе настоящего исследования было зарегистрировано также достоверное повышение уровня SCL11 в крови у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (в 1,7 и 2,0 раза соответственно), по сравнению с таковым у

здоровых доноров. У пациентов с ТЛ без эозинофилии содержание CCL11 в крови соответствовало контрольным значениям (табл. 9).

Таблица 11

Содержание CCL11 в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам
(пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		25,19 (18,27-34,31)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	42,73 (30,79-50,54) $p_1 < 0,05$	54,32 (44,92-67,32) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	44,78 (39,45-50,27) $p_1 < 0,05$	58,09 (44,12-62,40) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	27,05 (23,44-31,79) $p_2 < 0,05$	30,12 (26,66-46,73) $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	31,83 (23,45-40,21)	30,22 (37,79-43,64) $p_2 < 0,05$

Достоверное увеличение уровня данного медиатора в крови отмечалось у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с аналогичным параметром у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии (в 1,6 и 1,4 раза соответственно). Статистически значимых различий в содержании CCL11 у больных ТЛ (с эозинофилией и без таковой) в зависимости от формы заболевания зарегистрировано не было ($p_3 > 0,05$).

3.1.2. Содержание IL-5 и CCL11 в крови в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам

У больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, независимо от

лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП и формы ТЛ средние значения содержания IL-5 многократно превышали аналогичный параметр у здоровых доноров и пациентов с ТЛ без эозинофилии. Так, при ИТЛ с эозинофилией, как при лекарственно-чувствительном (ЛЧ) ТЛ, так и лекарственно-устойчивом (ЛУ) его вариантах, отмечалось достоверное увеличение IL-5 в крови (более чем в 8,0 раз) по сравнению с контрольными значениями. При этом у больных ЛУ ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, средний уровень IL-5 в 1,3 раза превышал соответствующий показатель у пациентов с ЛЧ-вариантом ДТЛ ($p_4 < 0,05$) (табл. 10).

При сравнительной оценке содержания SCL11 в крови у больных ТЛ с учетом лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП были выявлены статистически значимые различия только при ТЛ, сопровождающемся эозинофилией. У пациентов с ИТЛ и ДТЛ в сочетании с эозинофилией, выделяющих лекарственно-резистентные штаммы МБТ, средние значения концентрации SCL11 в 1,2 и 1,3 раза соответственно превышали таковые у больных ЛЧ ТЛ ($p_4 < 0,05$) (табл. 11).

3.2. Содержание IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких

*3.2.1. Содержание IL-5RA- и CCR3-позитивных эозинофилов *in vitro* в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови и формы заболевания*

Исследование способности эозинофильных гранулоцитов экспрессировать α -субъединицу мембраносвязанной формы рецептора к IL-5 (IL-5RA/CD125) позволило констатировать достоверное увеличение содержания IL-5RA-позитивных клеток в интактной культуре эозинофилов *in vitro* у всех больных ТЛ с эозинофилией по сравнению с таковым у здоровых доноров (5,16 (3,70-6,45) %).

Сравнительный анализ содержания IL-5RA-положительных клеток в интактной культуре эозинофилов у больных ТЛ в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови показал статистически значимое увеличение их числа при ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимися эозинофилией, по сравнению с таковыми у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 12).

Таблица 12

Содержание IL-5RA-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IL-5RA-позитивные эозинофилы	
		Интактная культура	С рекомбинантным IL-5
Здоровые доноры		5,16 (3,70-6,45)	7,60 (5,91-11,78) $p_4 > 0,05$
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	20,86 (16,20-23,35) $p_1 < 0,05$	44,88 (34,45-55,15) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	24,61 (9,89-29,32) $p_1 < 0,05$	30,12 (17,89-32,34) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	4,15 (3,81-11,52) $p_2 < 0,05$	11,93 (9,85-24,48) $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	7,22 (5,24-19,97) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	10,30 (9,39-13,32) $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 13: 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 анализом базального уровня экспрессии CD125 на мембране эозинофильных гранулоцитов, отражающего фоновую активность клеток, в ходе настоящего исследования была проведена оценка способности эозинофилов к экспрессии рецептора при добавлении *in vitro* экзогенного рекомбинантного IL-5 (rIL-5).

В результате исследования было установлено достоверное повышение количества IL-5RA-позитивных эозинофилов у больных ТЛ с эозинофилией по

сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров. При этом у больных ИТЛ и ДТЛ в сочетании с эозинофилией крови содержание IL-5RA-положительных клеток в культуральной суспензии эозинофилов с rIL-5 в 3,8 и 2,9 раза (соответственно) превышало аналогичные параметры у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии (табл. 12).

Анализируя соотношение числа эозинофилов, несущих молекулу CD125, в культуре клеток с rIL-5 к таковому в интактной культуре (индекс стимуляции) внутри одной группы обследованных было установлено, что данный индекс у здоровых доноров был равен 1,47 усл. ед. и лишь у больных ИТЛ с эозинофилией (2,14 усл. ед., $p_4 < 0,05$) и без таковой (2,83 усл. ед., $p_4 < 0,05$) достоверно превышал контрольные значения.

При оценке содержания CCR3-позитивных клеток в базальной культуре эозинофилов *in vitro* было установлено достоверное увеличение содержания клеток, несущих CCR3, только у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров. В свою очередь, у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофильной реакцией крови количество CCR3-экспрессирующих эозинофилов соответствовало норме (табл. 13).

При сравнительном анализе числа эозинофильных лейкоцитов, экспрессирующих CCR3, наибольшее количество CCR3-позитивных эозинофилов (54,69 (46,81-63,49)%) в крови было выявлено у пациентов с ДТЛ без эозинофилии. Исследование культуры эозинофилов, индуцированной *in vitro* рекомбинантным IL-5, позволило констатировать достоверное увеличение содержания CCR3-позитивных клеток только у пациентов с ИТЛ и ДТЛ без эозинофильной реакции крови по сравнению с соответствующим показателем у здоровых доноров. В свою очередь, у больных ТЛ, сопряженным с эозинофилией, количество эозинофилов, несущих CCR3, напротив, было ниже соответствующих показателей у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 13).

Кроме того, у больных ИТЛ было показано статистически значимое увеличение содержания CCR3-позитивных эозинофилов в IL-5-индуцированной культуральной суспензии клеток *in vitro* относительно их количества в интактной культуре независимо от наличия эозинофильной реакции крови (табл. 13). При

этом индексы стимуляции экспрессии CCR3, равные 2,54 усл. ед. (у больных ИТЛ с эозинофилией) и 2,04 усл. ед. (у больных ИТЛ без эозинофилии) были сопоставимыми с нормой (2,97 усл. ед.).

Таблица 13

Содержание CCR3⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (%) Me (Q₁-Q₃)

Группы обследованных лиц		CCR3-позитивные эозинофилы	
		Интактная культура	С рекомбинантным IL-5
Здоровые доноры		6,34 (5,12-7,02)	18,87 (9,13-20,72) p ₄ <0,05
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	5,67 (3,14-6,38)	14,47 (10,32-29,61) p ₄ <0,05
	Диссеминированный	8,21 (7,79-18,52)	12,76 (8,15-22,34)
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	17,90 (14,56-19,52) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	36,63 (23,36-47,28) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₄ <0,05
	Диссеминированный	54,69 (46,81-63,49) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	45,99 (35,31-72,42) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05

3.2.2. Содержание IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам

При исследовании содержания IL-5RA-позитивных эозинофилов в интактной и IL-5-индуцированной культурах клеток у больных ТЛ с учетом чувствительности возбудителя к ПТП было установлено статистически значимое увеличение числа IL-5RA⁺ эозинофилов как при лекарственно-чувствительном, так и при лекарственно-устойчивом вариантах ТЛ, сопровождающегося эозинофилией (p₄>0,05).

Индекс стимуляции экспрессии CD125 на эозинофилах у пациентов с инфильтративным ЛЧ ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, оказался равным 1,96 усл. ед., а при лекарственно-резистентном его варианте - 1,55 усл. ед., однако выявленные изменения не достигали статистически значимого уровня. При этом у больных ТЛ без эозинофилии индекс стимуляции экспрессии эозинофилами IL-5RA достоверно превышал контрольные значения лишь у пациентов с лекарственно-устойчивым ИТЛ (табл. 14).

Анализ количества эозинофилов, экспрессирующих CCR3, у больных ТЛ в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП показал достоверное увеличение числа CCR3⁺ клеток в базальной и индуцированной культурах у пациентов как с ЛЧ ТЛ, так и ЛУ ТЛ без эозинофилии ($p_1 < 0,05$) (табл. 15).

У больных ИТЛ без эозинофилии независимо от лекарственной чувствительности возбудителя было зарегистрировано статистически значимое увеличение содержания CCR3-положительных эозинофилов при индукции клеток рекомбинантным IL-5 *in vitro* относительно их количества в интактной культуре (табл. 15). При этом индексы стимуляции экспрессии CCR3, равные 2,20 усл. ед. (у больных ЛЧ ИТЛ) и 2,10 усл. ед. (у больных ЛУ ИТЛ), были сопоставимыми и не отличались от контрольных значений.

Таким образом, в результате проведенного исследования у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, установлен дисбаланс секреции эозинофил-активирующих медиаторов и экспрессии цитокин-рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов.

При ТЛ, ассоциированном с эозинофилией крови, независимо от формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП, установлены высокие концентрации IL-5 и CCL11 в сыворотке крови (табл. 14, 15). Высокое содержание клеток, несущих рецептор к IL-5, отмечался только у больных ТЛ с эозинофилией, в то время как повышенное число CCR3-позитивных эозинофилов выявлялось при ТЛ без эозинофильной реакции крови. При инкубации эозинофилов с рекомбинантным IL-5 *in vitro* был установлен факт повышения их IL-5RA-экспрессирующей активности при одновременном увеличении экспрессии рецептора к CCL11 у больных ЛЧ ИТЛ и ЛУ ИТЛ с эозинофилией и без (табл. 15).

Таблица 14

Содержание IL-5RA⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная культура, в знаменателе – с рекомбинантным IL-5) (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		5,16 (3,70-6,45)	
		7,60 (5,91-11,78)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	20,93 (17,73-24,23) p ₁ <0,05	22,47 (18,01-24,99) p ₁ <0,05
		41,18 (39,13-52,47) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	34,45 (26,37-40,01) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	16,20 (11,29-21,71) p ₁ <0,05	15,35 (10,25-19,53) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
		22,07 (19,51-25,92) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	21,44 (17,62-22,01) p ₁ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	6,82 (4,28-11,95) p ₂ <0,05	4,15 (3,94-6,83) p ₂ <0,05
		10,72 (7,92-18,39) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	9,45 (7,11-14,52) p ₂ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	8,15 (6,23-11,42) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	9,97 (8,00-16,03) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
		12,67 (8,38-12,99) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	11,14 (10,09-13,62) p ₂ <0,05

Примечание. Здесь и в табл. 15: 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 – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; p₅ – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Таблица 15

Содержание CCR3⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная культура, в знаменателе – с рекомбинантным IL-5) (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-Устойчивый
Здоровые доноры		6,34 (5,12-7,02)	
		18,87 (9,13-20,72)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	5,94 (4,17-6,25)	5,41 (3,10-5,73)
		12,64 (11,37-24,13) p ₅ <0,05	14,57 (10,09-27,29) p ₅ <0,05
	Диссеминированный	8,02 (7,00-11,21)	8,89 (7,01-12,92) p ₃ <0,05
		13,28 (9,19-21,33)	10,76 (8,96-19,39) p ₁ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	18,09 (16,47-19,52) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	17,66 (14,82-19,25) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
		39,18 (21,17-44,83) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₅ <0,05	36,11 (20,32-41,29) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	51,02 (37,25-53,74) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	56,48 (27,18-63,17) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
		63,27 (48,32-70,62) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	65,49 (44,37-71,48) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05

3.3. Анализ распределения генотипов и аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов у больных туберкулезом легких

Доминирующим фактором, обуславливающим функциональную активность цитокинов и их рецепторов у отдельного индивида, является аллельный полиморфизм генов. В связи с этим, в ходе настоящего исследования проводилась

оценка ассоциаций носительства полиморфизма генов эозинофил-активирующих цитокинов и их рецепторов с количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической крови, уровнем секреции соответствующих цитокинов и экспрессией рецепторных структур на примере двух общих групп пациентов: больные ТЛ с эозинофилией и без таковой.

При исследовании распределения частоты генотипов полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5* было выявлено, что во всех группах обследованных лиц гомозиготный генотип *CC* преобладал над гомозиготным по аллелю *T* генотипом полиморфизма *C-703T* гена *IL5*. Среди больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, гомозиготный генотип *CC* (67,6%) исследуемого полиморфного сайта встречался почти в 3,0 раза чаще, чем гетерозиготный *CT* (23,5%), и в 8,0 раз чаще, чем гомозиготный генотип по аллелю *T* (8,8%) (табл. 16).

Таблица 16

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *C-703T* гена *IL5*
(% (абс.)) у больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц	Генотипы			χ^2	Аллели		χ^2
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>		<i>C</i>	<i>T</i>	
Здоровые доноры n=120	49,2% (59)	44,2% (53)	6,7% (8)	-	71,3%	28,8%	-
Больные туберкулезом легких с эозинофилией n=102	67,6% (69)	23,5% (24)	8,8% (9)	10,37 $p_1 < 0,05$	79,4%	20,6%	3,92 $p_1 = 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии n=115	50,4% (58)	36,5% (42)	13,0% (15)	3,31 $p_1 > 0,05$ 6,61 $p_2 < 0,05$	68,7%	31,3%	0,36 $p_1 > 0,05$ 6,41 $p_2 < 0,05$

Примечание: Здесь и в табл. 17, 18, 19: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией.

В группе больных ТЛ без эозинофилии отмечались сходные тенденции, наиболее часто встречался гомозиготный генотип *CC* (50,4%) данного полиморфизма.

Статистический анализ выявил значимые различия в распределении генотипов полиморфизма *C-703T* гена *IL5* между здоровыми донорами и больными ТЛ,

сопровождаящимся эозинофилией ($\chi^2=10,37$; $p_1<0,05$), при отсутствии таковых у больных ТЛ без эозинофилии. Показаны существенные различия в распределении аллелей ($\chi^2=6,41$, $p_2<0,05$) и генотипов ($\chi^2=6,61$, $p_2<0,05$) полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5* у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой (табл. 16).

При исследовании полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA* у здоровых лиц зарегистрировано преобладание гомозиготного генотипа *GG* (52,5%) и гетерозиготного варианта *GA* (42,5%) над гомозиготным генотипом *AA* (5,0%). У больных ТЛ с эозинофилией и без эозинофилии также преобладали генотипы *GG* и *GA*, а наиболее редким оказался гомозиготный по аллелю *A* генотип полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA* (табл. 17).

Таблица 17

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA*
(%, (абс.)) у больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц	Генотипы			χ^2	Аллели		χ^2
	<i>GG</i>	<i>GA</i>	<i>AA</i>		<i>G</i>	<i>A</i>	
Здоровые доноры n=120	52,5% (63)	42,5% (51)	5,0% (6)	-	73,75%	26,25%	-
Больные туберкулезом легких с эозинофилией n=102	54,9% (56)	33,3% (34)	11,8% (12)	4,38 $p_1>0,05$	71,6%	28,4%	0,26 $p_1>0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии n=115	57,4% (66)	36,5% (42)	6,1% (7)	0,91 $p_1>0,05$	75,7%	24,3%	0,22 $p_1>0,05$
				2,21 $p_2>0,05$			0,93 $p_2>0,05$

Проведенный статистический анализ не позволил выявить значимых различий в распределении аллелей и генотипов полиморфизма *G-80A* гена *IL-5RA* у больных ТЛ с эозинофилией ($\chi^2=0,26$, $p_1>0,05$ и $\chi^2=4,38$, $p_1>0,05$) и без таковой ($\chi^2=0,22$, $p_1>0,05$ и $\chi^2=0,91$, $p_1>0,05$) относительно аналогичных параметров у здоровых доноров. Не удалось установить достоверной разницы между распределением аллелей и генотипов данного полиморфизма и при сравнении групп больных ТЛ в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови ($\chi^2=0,93$, $p_2>0,05$ и $\chi^2=2,21$, $p_2>0,05$).

Анализ распределения генотипов полиморфного сайта *A-384G* гена *CCL11*

показал, что среди пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови, чаще встречались носители гомозиготного генотипа *AA* (44,1%), реже - генотипа *GG* (24,5%). Среди больных ТЛ без эозинофилии также преобладали носители гомозиготного генотипа *AA* (51,3%) данного полиморфизма, реже встречался генотип *AG* (33,9%), наиболее редким оказался гомозиготный генотип *GG* (14,8%) (табл. 18).

Таблица 18

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *A-384G* гена *CCL11*
(%(абс.)) у больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц	Генотипы			χ^2	Аллели		χ^2
	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>		<i>A</i>	<i>G</i>	
Здоровые доноры n=120	58,3% (70)	32,5% (39)	9,2% (11)	-	74,6%	25,4%	-
Больные туберкулезом легких с эозинофилией n=102	44,1% (45)	31,4% (32)	24,5% (25)	10,18 $p_1 < 0,01$	59,8%	40,2%	11,03 $p_1 < 0,001$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии n=115	51,3% (59)	33,9% (39)	14,8% (17)	2,12 $p_1 > 0,05$ 3,33 $p_2 > 0,05$	68,3%	31,7%	2,30 $p_1 > 0,05$ 3,37 $p_2 > 0,05$

При сравнительном исследовании у больных ТЛ с эозинофильной реакцией крови гомозиготный генотип *AA* полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* встречался реже (44,1%) по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (58,3%) и больных ТЛ без эозинофилии (51,3%), а гомозиготный генотип *GG* регистрировался, напротив, чаще (24,5%). Частота встречаемости гетерозиготного генотипа *AG* данного полиморфного участка при ТЛ с эозинофилией, ТЛ без эозинофилии и у здоровых доноров была практически сопоставимой (31,4%, 33,9% и 32,5% соответственно) (табл. 18).

В ходе статистического анализа были обнаружены достоверные различия в распределении аллелей ($\chi^2=11,03$, $p_1 < 0,001$) и генотипов ($\chi^2=10,18$, $p_1 < 0,01$) полиморфного сайта *A-384G* гена *CCL11* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и у здоровых доноров. Однако при сравнении распределения аллельных вариантов и генотипов полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* у пациентов с

ТЛ в зависимости от числа эозинофильных гранулоцитов в периферической крови статистически значимых различий выявлено не было (табл. 18).

При исследовании полиморфизма *T-51C* гена *CCR3* у здоровых доноров было зарегистрировано преобладание гомозиготного генотипа *TT* (51,7%) над гетерозиготным генотипом *TC* (34,2%) и гомозиготным *CC* вариантом (14,2%) (табл. 19).

Таблица 19

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма *T-51C* гена *CCR3*
(%, (абс.)) у больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц	Генотипы			χ^2	Аллели		χ^2
	<i>TT</i>	<i>TC</i>	<i>CC</i>		<i>T</i>	<i>C</i>	
Здоровые доноры n=120	51,7% (62)	34,2% (41)	14,2% (17)	-	68,8%	31,2%	-
Больные туберкулезом легких с эозинофилией n=102	42,2% (43)	30,4% (31)	27,5% (28)	6,10 $p_1=0,05$	57,4%	42,6%	6,18 $p_1=0,01$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии n=115	56,5% (65)	33,1% (38)	10,4% (12)	0,94 $p_1>0,05$ 10,85 $p_2<0,01$	73,0%	27,0%	1,05 $p_1>0,05$ 11,81 $p_2<0,001$

В группе больных ТЛ с эозинофилией и без таковой наиболее распространенным генотипом также оказался гомозиготный по аллелю *T* вариант, а наиболее редким гомозиготный генотип *CC*. Однако среди больных ТЛ с эозинофильной реакцией крови носители гомозиготного варианта *TT* полиморфного участка *T-51C* гена *CCR3* встречались реже (42,2%), чем среди больных ТЛ без эозинофилии (56,5%), а носители гомозиготного *CC* генотипа, напротив, чаще (27,5% и 10,4% соответственно). Следует отметить, что частота встречаемости данных генотипов у больных ТЛ без эозинофилии соответствовала таковой в группе контроля (табл. 19).

При статистическом анализе установлены достоверные различия в распределении аллельных вариантов ($\chi^2=6,18$, $p_1=0,01$) и генотипов ($\chi^2=6,10$, $p_1=0,05$) полиморфного сайта *T-51C* гена *CCR3* у больных ТЛ, сопровождающимся

эозинофилией, и у здоровых доноров. Статистически значимых различий в распределении генотипов и аллелей этого полиморфизма между больными ТЛ без эозинофилии и здоровыми донорами выявлено не было.

Обращали на себя внимание статистически значимые различия в распределении аллелей ($\chi^2=11,81$, $p_2<0,001$) и генотипов ($\chi^2=10,85$, $p_2<0,01$) полиморфного участка *T-51C* гена *CCR3* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией и без таковой.

3.4. Связь аллельного полиморфизма генов с содержанием эозинофил-активирующих цитокинов в крови и IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких

Аллельный полиморфизм, как результат точечных мутаций, в большинстве случаев ассоциирован с некодирующими участками генов цитокинов и их рецепторов или затрагивает область промотора, не оказывая при этом влияния на аминокислотную последовательность транслируемого белка. Однако часть нуклеотидных замен в промоторной области может изменять скорость транскрипции гена, определять время жизни цитоплазматической мРНК и тем самым опосредовать увеличение или уменьшение концентрации кодируемого белкового продукта, влиять на его функциональную активность [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005].

В связи с этим нами была предпринята попытка выявить ассоциации аллельных вариантов полиморфных сайтов *C-703T* гена *IL5*, *G-80A* гена *IL5RA*, *A-384G* гена *CCL11* и *T-51C* гена *CCR3* с уровнем продукции соответствующих цитокинов и экспрессией их рецепторов на эозинофилах.

Известно, что полиморфизм *C-703T* гена *IL5* находится в промоторной области гена, что связано с уровнем экспрессии гена, а, соответственно, и с уровнем синтеза кодируемого продукта. При анализе зависимости содержания IL-5 в крови от аллельного варианта полиморфизма *C-703T* гена *IL5* было обнаружено, что у здоровых доноров и больных ТЛ максимальная концентрация IL-5 в крови регистрировалась у носителей гомозиготного генотипа по аллелю *C*, а минимальная – у носителей гомозиготного генотипа по аллелю *T* (табл. 20).

Во всех группах обследованных лиц было выявлено статистически значимое увеличение концентрации IL-5 в крови у гомозигот по аллелю *C* по сравнению с гетерозиготами *CT* ($p_{CC/CT} < 0,05$) и гомозиготами по аллелю *T* ($p_{CC/TT} < 0,05$), а также у гетерозигот *CT* по сравнению с гомозиготами по аллелю *T* ($p_{CT/TT} < 0,05$) полиморфизма *C-703T* гена *IL5* (табл. 20).

Таблица 20

Содержание IL-5 в крови (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *C-703T* гена *IL5* (Me (Q_1-Q_3))

Генотипы полиморфизма <i>C-703T</i> гена <i>IL5</i>	Группы обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		С эозинофилией	Без эозинофилии
<i>CC</i>	15,21 (12,56-16,81) $p_{CC/CT} < 0,05$	57,50 (45,46-63,49) $p_{CC/CT} < 0,05$ $p_1 < 0,05$	22,15 (19,43-31,85) $p_{CC/CT} < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<i>CT</i>	9,13 (8,05-13,26) $p_{CT/TT} < 0,05$	44,90 (35,69-45,03) $p_{CT/TT} < 0,05$ $p_1 < 0,05$	17,43 (11,97-21,86) $p_{CT/TT} < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<i>TT</i>	7,81 (7,56-11,42) $p_{CC/TT} < 0,05$	41,40 (38,75-42,80) $p_{CC/TT} < 0,05$ $p_1 < 0,05$	8,84 (7,38-12,71) $p_{CC/TT} < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; $p_{CC/CT}$, $p_{CT/TT}$, $p_{CC/TT}$ – в зависимости от аллельного варианта локуса *C-703T* гена *IL5*.

Следует отметить, что у больных ТЛ с эозинофилией средние значения содержания IL-5 среди гомозигот *CC* и *TT*, а также гетерозигот *CT* в 3,8, 5,3 и 4,9 раза соответственно превышали аналогичные параметры у здоровых доноров ($p_1 < 0,05$). Было выявлено также статистически значимое повышение уровня данного цитокина у больных ТЛ с эозинофилией, несущих генотипы *CC*, *CT* и *TT* полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5*, по сравнению с таковым у больных ТЛ без эозинофилии ($p_2 < 0,05$) (табл. 20).

Анализируя содержание IL-5RA-позитивных эозинофилов в зависимости от

аллельного варианта полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA*, следует отметить, что среди всех групп обследованных лиц (носителей генотипов *GG*, *AA* и *GA*) количество эозинофилов, экспрессирующих IL-5RA, в базальной и индуцированной культурах клеток оказалось сопоставимым (табл. 21).

Таблица 21

Содержание IL-5RA-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* ($\times 10^6$ /мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *G-80 A* гена *IL5RA* (Me (Q₁-Q₃))

IL-5RA-позитивные эозинофилы		Группы обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
			С эозинофилией	Без эозинофилии
<i>GG</i>	Интактная культура	0,049 (0,026-0,051)	0,198 (0,132-0,241) $p_1 < 0,05$	0,067 (0,060-0,075) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	С рекомбинантным IL-5	0,054 (0,041-0,073)	0,346 (0,253-0,414) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,101 (0,096-0,120) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
<i>GA</i>	Интактная культура	0,052 (0,034-0,059)	0,204 (0,174-0,248) $p_1 < 0,05$	0,079 (0,068-0,097) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	С рекомбинантным IL-5	0,057 (0,044-0,069)	0,354 (0,298-0,401) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,114 (0,100-0,129) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
<i>AA</i>	Интактная культура	0,059 (0,043-0,065)	0,247 (0,195-0,264) $p_1 < 0,05$	0,071 (0,055-0,121) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	С рекомбинантным IL-5	0,063 (0,052-0,078)	0,426 (0,351-0,447) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,087 (0,098-0,112) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

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 – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных; $p_{GG/GA}$, $p_{GA/AA}$, $p_{GG/AA}$ – в зависимости от аллельного варианта локуса *G-80 A* гена *IL5RA*.

При этом у больных ТЛ с эозинофилией количество IL-5RA-положительных

эозинофилов в интактной культуре и в условиях инкубации с рекомбинантным (r) IL-5 достоверно превышало соответствующие показатели в группе здоровых доноров ($p_1 < 0,05$) и у больных ТЛ без эозинофилии ($p_2 < 0,05$) (табл. 21).

Статистический анализ позволил также установить значимое увеличение количества IL-5RA-позитивных эозинофилов в культуре клеток *in vitro*, индуцированной rIL-5, у больных ТЛ с эозинофилией, имеющих генотипы *GG*, *GA* и *AA*, относительно соответствующих значений в интактной культуре клеток. У больных ТЛ без эозинофильной реакции крови отмечалась сходная тенденция, однако статистически значимые различия были показаны только для носителей генотипов *GG* и *GA* (табл. 21).

Согласно данным литературы, аллельные варианты полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* могут обуславливать различный фенотипический эффект. При изучении сывороточного уровня эотаксина-1 в зависимости от аллельных вариантов полиморфного сайта *A-384G* гена *CCL11* было установлено, что среди всех обследованных лиц максимальный уровень данного медиатора в крови регистрировался у гомозигот по аллелю *G*, а минимальный - у гомозигот по аллелю *A*. Выявленные изменения достигали статистически значимого уровня только у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией ($p_{AA/GG} < 0,05$ и $p_{AG/GG} < 0,05$). В группах больных ТЛ без эозинофилии и у здоровых доноров достоверных отличий выявлено не было (табл. 22).

Следует отметить, что концентрация *CCL11* в крови у больных ТЛ с эозинофилией достоверно превышала аналогичные показатели у здоровых доноров: более чем в 1,5 раза - у носителей генотипа *AA*, в 1,6 и в 1,8 раза соответственно - у носителей генотипов *AG* и *GG* полиморфизма *A-384G* гена *CCL11*. Среди больных ТЛ без эозинофилии высокая концентрация эотаксина-1 в крови отмечалась лишь у гетерозигот *AG* (*A-384G*) по сравнению с контрольными значениями. Кроме этого, было установлено статистически значимое увеличение уровня *CCL11* у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (носителей генотипов *AA*, *GG* и *AG* полиморфного участка *A-384G* гена *эотаксина-1*), по сравнению с таковым у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 22).

Содержание CCL11 в крови (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *A-384G* гена *CCL11* (Me (Q₁-Q₃))

Генотипы полиморфизма <i>A-384G</i> гена <i>CCL11</i>	Характеристика обследованных лиц		
	Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
		С эозинофилией	Без эозинофилии
<i>AA</i>	24,32 (18,27-27,31)	36,60 (27,63-41,84) $p_1 < 0,05$	29,56 (27,45-36,87) $p_2 < 0,05$
<i>AG</i>	26,74 (21,13-29,87)	41,53 (34,78-50,49) $p_{AG/GG} < 0,05$ $p_1 < 0,05$	33,79 (31,77-40,06) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<i>GG</i>	29,06 (22,76-33,51)	51,42 (48,86-56,45) $p_{AA/GG} < 0,05$ $p_1 < 0,05$	34,95 (29,06-45,39) $p_2 < 0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; $p_{AA/AG}$, $p_{AG/GG}$, $p_{AA/GG}$ – в зависимости от аллельного варианта локуса *A-384G* гена *CCL11*.

Известно, что полиморфизм *T-51C* расположен в промоторной области гена *CCR3*, следовательно, замена тимина на цитозин в позиции -51 п.н. относительно стартовой точки транскрипции может быть связана с уровнем экспрессии гена, а, соответственно, и с уровнем синтеза кодируемого белка.

В результате исследования было показано, что у здоровых доноров и больных ТЛ (независимо от наличия эозинофильной реакции крови) в случае носительства генотипа *CC* в интактной культуре клеток имела место тенденция к увеличению числа эозинофилов, несущих *CCR3*, в сравнении с таковым у носителей других генотипов, т.е. у гомозигот по аллелю *T* и гетерозигот *TC*, у которых содержание *CCR3*-позитивных эозинофилов варьировало в более низких пределах. При этом статически значимых различий выявлено не было (табл. 23).

Обращало на себя внимание также увеличение содержания *CCR3*-экспрессирующих эозинофилов в интактной культуре и в условиях инкубации с рекомбинантным IL-5 среди больных ТЛ без эозинофилии (у носителей генотипов

TT, *CC* и *TC*) по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров. Помимо этого, содержание CCR3-положительных эозинофилов в базальной и индуцированной культурах клеток у пациентов с ТЛ без эозинофилии достоверно превышало соответствующие параметры у больных ТЛ с эозинофилией (носителей аналогичных генотипов) ($p_2 < 0,05$).

Таблица 23

Содержание CCR3-положительных клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* ($\times 10^6/\text{мл}$) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *T-51C* гена *CCR3* (Me (Q_1-Q_3))

CCR3-положительные эозинофилы		Группы обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
			С эозинофилией	Без эозинофилии
<i>TT</i>	Интактная культура	0,059 (0,053-0,067)	0,065 (0,054-0,123)	0,244 (0,201-0,276) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	С рекомбинантным IL-5	0,123 (0,097-0,203) $p_3 < 0,05$	0,126 (0,106-0,294) $p_3 < 0,05$	0,289 (0,043-0,307) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<i>TC</i>	Интактная культура	0,063 (0,044-0,071)	0,078 (0,066-0,149)	0,271 (0,240-0,304) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	С рекомбинантным IL-5	0,117 (0,106-0,131) $p_3 < 0,05$	0,097 (0,075-0,104)	0,294 (0,256-0,300) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
<i>CC</i>	Интактная культура	0,068 (0,059-0,075)	0,084 (0,080-0,100)	0,312 (0,197-0,321) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	С рекомбинантным IL-5	0,137 (0,118-0,165) $p_3 < 0,05$	0,107 (0,094-0,131)	0,293 (0,187-0,326) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

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 – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных; $p_{TT/TC}$, $p_{TC/CC}$, $p_{TT/CC}$ – в зависимости от аллельного варианта локуса *T-51C* гена *CCR3*.

Статистический анализ позволил констатировать также достоверное увеличение содержания CCR3-позитивных клеток в индуцированной культуре эозинофилов *in vitro* у здоровых доноров (имеющих генотипы *TT*, *CC* и *TC*) относительно соответствующих значений в интактной культуре ($p_3 < 0,05$). У больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, отмечалась сходная тенденция, однако статистически значимые различия были показаны только для носителей гомозиготного генотипа *TT* ($p_3 < 0,05$) (табл. 23).

Таким образом, в результате проведенного исследования идентифицированы «высокородуцирующие» генотипы *CC* полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5* (у здоровых доноров и больных ТЛ) и *GG* полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* (у больных ТЛ с эозинофилией), обуславливающие высокие концентрации IL-5 и CCL11 в крови. Изменение числа эозинофильных гранулоцитов, экспрессирующих на своей поверхности рецепторы IL-5RA и CCR3, не связано с полиморфными вариантами *G-80A* гена *IL5RA* и *T-51C* гена *CCR3*.

3.5. Содержание CD9⁺ и CD18⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких

Согласно данным литературы, эозинофильные гранулоциты несут на своей поверхности разнообразные адгезионные структуры, среди которых выделяют L-селектин и сиалил- Le^X , CD162 или PSGL, а также широкий спектр молекул адгезии семейства интегринов. Для изучения адгезионных свойств эозинофильных клеток в настоящем исследовании были оценены поверхностные структуры, обеспечивающие прочное связывание и миграцию эозинофилов через сосудистый эндотелий – CD18 (общая субъединица Mac-1, LFA-1 и CR4) и CD9 (молекула адгезии семейства тетраспанинов).

3.5.1. Содержание CD9⁺ и CD18⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови и формы заболевания

При исследовании способности эозинофильных гранулоцитов экспрессировать общую субъединицу CD18 было установлено достоверное увеличение содержания CD18⁺ клеток в культуре эозинофильных гранулоцитов *in vitro* у всех больных ТЛ по сравнению с таковым у здоровых доноров. При этом у

пациентов с ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимися эозинофилией, содержание CD18-несущих клеток в культуре эозинофилов в 2,0 и 2,9 раза соответственно превышало аналогичные параметры у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии ($p_2 < 0,05$). Сравнительная оценка числа эозинофильных лейкоцитов, экспрессирующих CD18, в зависимости от формы заболевания внутри каждой группы пациентов (с эозинофилией и без) не выявила статистически значимых различий (табл. 24).

Таблица 24

Содержание CD9⁺ и CD18⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		CD9 ⁺ эозинофилы	CD18 ⁺ эозинофилы
Здоровые доноры		3,02 (2,01-3,84)	5,36 (3,37-6,75)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	3,38 (3,12-5,15)	21,54 (19,49-24,36) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	3,67 (3,40-6,12)	20,40 (18,50-27,31) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	4,12 (3,62-6,29)	10,67 (9,85-16,48) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	1,92 (0,89-3,01) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	7,03 (6,08-15,43) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

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.

Анализ количества эозинофилов, экспрессирующих на своей мембране молекулу адгезии CD9, показал, что у всех больных ТЛ независимо от наличия эозинофильной реакции крови и формы заболевания содержание CD9-позитивных эозинофилов в культуре клеток *in vitro* соответствовало контрольным значениям.

При этом у больных ДТЛ без эозинофилии количество эозинофилов, несущих CD9, было ниже, чем у больных ДТЛ с эозинофилией ($p_2 < 0,05$) и ИТЛ без эозинофилии ($p_3 < 0,05$) (табл. 24).

3.5.2. Содержание CD9⁺ и CD18⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам

Сравнительное исследование количества эозинофилов, экспрессирующих CD9, у больных ТЛ в зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП показало разнонаправленные изменения содержания CD9⁺ эозинофилов в культуре клеток у пациентов с лекарственно-резистентным ТЛ без эозинофилии: снижение числа CD9⁺ клеток при ДТЛ и увеличении данного показателя у больных ИТЛ ($p_1 < 0,05$). У больных ТЛ с эозинофилией вне зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП статистически значимых изменений содержания CD9-положительных эозинофилов *in vitro* зарегистрировано не было (табл. 25).

При оценке содержания CD18-позитивных эозинофилов в культуре клеток у больных ТЛ с учетом чувствительности возбудителя к ПТП было установлено статистически значимое его увеличение у всех пациентов с ТЛ (исключение составили больные ЛЧ ДТЛ без эозинофилии) (табл. 26). Внутри каждой группы пациентов (с эозинофилией и без) в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП отсутствовали статистически значимые различия ($p_4 > 0,05$), отмечалась лишь тенденция к увеличению числа эозинофилов, экспрессирующих CD18, у пациентов с ЛЧ ИТЛ по сравнению с таковым при лекарственно-устойчивым его варианте.

Таким образом, в результате проведенного исследования у пациентов с ТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови установлен более высокий уровень экспрессии рецепторов, отвечающих за адгезию эозинофилов к сосудистому эндотелию и последующую их миграцию в ткани.

Таблица 25

Содержание CD9⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		3,02 (2,01-3,84)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	3,25 (3,14-4,45)	3,42 (3,21-5,07)
	Диссеминированный	4,05 (3,47-5,84)	3,93 (3,51-6,00)
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	4,13 (3,81-5,17)	4,75 (4,08-5,12) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	1,84 (1,09-3,00) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	1,36 (0,90-2,94) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (%) (Me (Q₁-Q₃))

Примечание. Здесь и в табл. 26: 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 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

Таблица 26

Содержание CD18⁺ клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		5,36 (3,37-6,75)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	24,41 (22,31-25,38) $p_1 < 0,05$	23,96 (18,83-26,66) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	20,40 (18,50-27,31) $p_1 < 0,05$	22,42 (20,82-27,02) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	13,50 (9,86-16,29) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	10,50 (9,92-13,57) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	7,11 (6,27-10,07)	7,95 (6,85-11,20)

		$p_2 < 0,05$	$p_1 < 0,05$
		$p_3 < 0,05$	$p_2 < 0,05$

3.6. Активность пероксидазы эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких

В состав специфических гранул эозинофильных лейкоцитов входит эозинофильная пероксидаза, обладающая широким спектром свойств, в том числе антибактериальной активностью. В первичных гранулах эозинофилов содержится также миелопероксидаза, при участии которой осуществляется микробицидное действие изучаемых клеток.

При исследовании активности пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах было зарегистрировано достоверное снижение данного показателя у всех пациентов с ТЛ по сравнению с аналогичным параметром у здоровых доноров (табл. 27). Обращало на себя внимание статистически значимое снижение активности эозинофильной пероксидазы у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии (в 1,5 и 1,3 раза соответственно) по сравнению с таковым у пациентов с ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофильной реакцией крови ($p_2 < 0,05$) (табл. 27).

Таблица 27

Активность пероксидазы эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (мккат/г) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Активность пероксидазы эозинофилов
Здоровые доноры		236,17 (181,50-299,80)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	142,13 (134,50-181,15) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	161,03 (139,41-170,20) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	96,65 (85,10-176,50) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	121,25 (115,93-149,17) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 29: 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.

Среди всех больных ТЛ (с эозинофилией и без таковой) не было зарегистрировано статистически значимых различий изменения пероксидазной активности в зависимости от формы заболевания ($p_3 > 0,05$). Сравнительный анализ активности пероксидазы в эозинофилах крови у больных ТЛ в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП показал достоверное снижение данного параметра лишь у пациентов с ЛУ ДТЛ без эозинофилии по сравнению с таковым у больных лекарственно-чувствительным вариантом ДТЛ без эозинофилии (табл. 28).

Таблица 28

Активность пероксидазы эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (мккат/г) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		236,17 (181,50 – 299,80)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	139,19 (136,56–170,52) $p_1 < 0,05$	157,83 (154,50–179,27) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	155,82 (149,13-164,20) $p_1 < 0,05$	164,48 (137,11-170,09) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	100,65 (95,10 – 176,50) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	102,67 (91,34-120,43) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	131,15 (121,96-149,17) $p_1 < 0,05$	101,28 (85,03-123,02) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 30: p_1 – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией; p_3 – у больных с инфильтративным туберкулезом легких; p_4 – у больных с лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

При ЛУ ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, отмечалась тенденция, напротив, к увеличению пероксидазной активности эозинофилов в сравнении с ЛЧ

ИТЛ и ДТЛ, однако выявленные изменения не достигали статистически значимого уровня (табл. 28).

Таким образом, при ТЛ установлено снижение активности пероксидазы эозинофилов, что, с одной стороны, может отражать усиление функциональной активности изучаемых клеток, а с другой, напротив, обуславливать дефицит цитотоксической активности эозинофильных гранулоцитов при туберкулезной инфекции.

3.7. Содержание фагоцитирующих клеток в культуре эозинофильных гранулоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких

Эозинофильные гранулоциты – это макрофаги, способные фагоцитировать иммунные комплексы, гранулы тучных клеток, бактерии и др. Для оценки фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов нами было выполнено цитометрическое исследование количества фагоцитирующих клеток, поглотивших *E. coli*, меченных флуоресцентной меткой FITC, в культуре эозинофилов *in vitro*.

В результате исследования было зарегистрировано достоверное повышение количества фагоцитирующих эозинофилов у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (в 2,2 и 3,4 раза соответственно), а также у пациентов с ИТЛ без эозинофилии (в 1,5 раза) по сравнению с таковым у здоровых доноров (табл. 29). Примечательно, что у больных ТЛ с эозинофилией содержание фагоцитирующих эозинофилов в культуре клеток *in vitro* достоверно превышало аналогичные показатели у больных ТЛ без эозинофилии ($p_2 < 0,05$). При сравнении числа эозинофильных лейкоцитов, поглотивших *E. coli*, в зависимости от формы заболевания, наибольшее количество FITC-меченных эозинофилов (29,34 (24,38-31,19)%) отмечалось у пациентов с ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией (табл. 29).

В зависимости от чувствительности МБТ к ПТП максимальное содержание фагоцитирующих эозинофилов было также зарегистрировано у больных ДТЛ с эозинофилией (при лекарственно-устойчивом варианте инфекции). При этом количество эозинофилов, поглотивших *E. coli*, в культуре клеток *in vitro* у больных

ЛЧ и ЛУ ИТЛ без эозинофилии не достигало статистически значимого уровня ($p_1 > 0,05$) (табл. 30).

Таблица 29

Фагоцитарная активность клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Количество фагоцитирующих <i>E. coli</i> эозинофилов
Здоровые доноры		8,79 (6,17-10,34)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	19,29 (16,20-23,35) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	29,34 (24,38-31,19) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	13,03 (9,81-15,52) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	10,82 (7,64-11,94) $p_2 < 0,05$

Таблица 30

Фагоцитарная активность клеток в культуре эозинофилов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		8,79 (6,17-10,34)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	20,04 (17,30-23,78) $p_1 < 0,05$	18,39 (16,28-21,21) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	25,12 (24,50-29,97) $p_1 < 0,05$	28,92 (21,28-30,17) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом	Инфильтративный	10,82 (9,92-13,07)	12,39 (10,19-14,83)

легких без эозинофилии		$p_2 < 0,05$	$p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	8,31 (7,62-10,38) $p_2 < 0,05$	9,02 (8,84-12,59) $p_2 < 0,05$

Таким образом, ТЛ характеризуется усилением фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов крови, способных осуществлять эффективную элиминацию патогена либо служить дополнительным резервуаром персистенции бактерий.

3.8. Показатели секреции цитокинов эозинофильными гранулоцитами крови *in vitro* у больных туберкулезом легких

Эозинофильные гранулоциты способны продуцировать, депонировать в своих гранулах и секретировать свыше 30 цитокинов и факторов роста, многие из которых обладают иммунорегуляторной активностью. Для оценки цитокинсекреторной функции эозинофилов крови при ТЛ в ходе настоящего исследования был изучен уровень продукции некоторых цитокинов клеточного и гуморального иммунного ответа в интактной и VCG-индуцированной культурах эозинофильных лейкоцитов *in vitro*.

*3.8.1. Продукция IL-5, IL-2 и TNF α эозинофильными гранулоцитами *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови и клинической формы заболевания*

При анализе содержания IL-5 в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов *in vitro*, выделенных из крови пациентов с ТЛ, было зарегистрировано увеличение данного показателя только у больных ТЛ с эозинофилией. Так, базальный уровень секреции IL-5 у больных ИТЛ с эозинофилией был повышенным в 2,5 раза, а у больных ДТЛ с эозинофилией - в 2,4 раза по сравнению с соответствующим показателем у здоровых доноров. В свою очередь, при ДТЛ без эозинофилии концентрация IL-5 в интактной культуре клеток, напротив, снижалась, а при ИТЛ без эозинофилии - не отличалась от контрольных значений (табл. 31).

При сравнении базальной *in vitro* секреции IL-5 у пациентов с туберкулезной инфекцией в зависимости от наличия эозинофилии крови нами были выявлены

статистически значимые различия. У больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией концентрация данного цитокина в культуре эозинофилов в 3,8 и 3,0 раза (соответственно) превышала аналогичные параметры у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии. Внутри каждой группы пациентов с эозинофилией и без таковой не было выявлено статистически значимых различий показателей *in vitro* секреции IL-5 эозинофильными гранулоцитами в зависимости от формы заболевания (табл. 31).

Таблица 31

Содержание IL-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IL-5	
		Интактная	BCG-индуцированная
Здоровые доноры		6,22 (3,13-10,75)	9,15 (4,51-12,61) $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инfiltrативный	15,61 (12,69-19,08) $p_1 < 0,05$	28,27 (22,03-36,08) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	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	Инfiltrативный	4,16 (2,31-12,80) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	4,92 (1,61-7,45) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	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. Здесь и в табл. 32, 33: 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 инfiltrативным туберкулезом легких; p_4 – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

В ходе настоящего исследования мы оценивали не только базальную секрецию медиаторов, отражающую общее состояние функциональной активности

клеток, но и индуцированную антигеном продукцию, которая характеризует реактивность клеток в ответ на стимуляцию. В качестве индуктора цитокинопродукции эозинофилов крови мы использовали вакцинный штамм BCG (живой аттенуированный штамм *M. bovis*), выбор которого обусловлен способностью лейкоцитов эозинофильного ряда непосредственно взаимодействовать с микобактериями различных видов, с последующим высвобождением широкого спектра факторов.

В результате исследования было установлено достоверное повышение BCG-индуцированной секреции IL-5 при ИТЛ и ДТЛ, сопровождающемся эозинофилией крови, по сравнению с контролем и соответствующими показателями базальной секреции цитокина ($p_4 < 0,05$). В случае ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии индуцированная продукция медиатора была, напротив, в 1,8 и 2,0 раза ниже таковой у здоровых доноров, но при этом по сравнению с базальным уровнем секреции она не изменялась (табл. 31).

При исследовании секреции IL-2 эозинофильными гранулоцитами *in vitro* были зарегистрированы разнонаправленные ее изменения как в интактной, так и индуцированной культурах клеток у больных ТЛ. При ИТЛ с эозинофилией установлены значимые отличия в сторону снижения базальной продукции IL-2, а при ДТЛ, ассоциированном с эозинофилией, напротив, отмечалось достоверное увеличение секреции данного цитокина по сравнению с таковой у здоровых доноров и больных ТЛ без эозинофилии (табл. 32).

У больных ТЛ без эозинофилии значимые различия в продукции IL-2 по сравнению с контрольными значениями отсутствовали и не зависели от формы заболевания. Примечательно, что на фоне индукции эозинофильных лейкоцитов вакцинным штаммом BCG продукция IL-2 сохранялась ниже нормы у пациентов с ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и без эозинофилии. У пациентов с ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, было зарегистрировано достоверное увеличение BCG-индуцированной секреции IL-2 по сравнению с его контрольным уровнем.

Таблица 32

Содержание IL-2 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IL-2	
		Интактная	BCG-индуцированная
Здоровые доноры		52,29 (24,45-69,50)	57,35 (30,70-65,76)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	38,37 (22,30-49,02) p ₁ <0,05	44,35 (28,99-50,27) p ₁ <0,05
	Диссеминированный	76,63 (51,50-80,15) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	67,05 (60,10-71,50) p ₁ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	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
	Диссеминированный	50,65 (23,42-71,35) p ₂ <0,05	52,25 (39,74-59,74) p ₂ <0,05 p ₃ <0,05

Что касается TNF α , то достоверное увеличение его спонтанной секреции *in vitro* было зарегистрировано только у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией. У больных ТЛ без эозинофилии, как при ИТЛ, так и при ДТЛ, данный показатель не отличался от контрольных значений (табл. 33). Отсутствовали статистически значимые различия показателей базальной продукции TNF α в зависимости от формы заболевания среди больных ТЛ с эозинофилией и без таковой.

Анализ BCG-индуцированной секреции TNF α показал ее выраженное повышение у пациентов с ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с

таковой у здоровых доноров и базальным уровнем продукции цитокина (табл. 33). При этом у больных ДТЛ с эозинофилией отмечалось увеличение данного показателя лишь относительно контрольных значений. У больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии BCG-индуцированная продукция TNF α была в 2,0 и 1,3 раза выше соответствующих уровней спонтанной секреции этого цитокина. Наиболее выраженное увеличение индуцированной секреции TNF α было отмечено у больных ИТЛ с эозинофилией и без нее ($p_1 < 0,05$, $p_4 < 0,05$) (табл. 33).

Таблица 33

Содержание TNF α в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		TNF α	
		Интактная	BCG-индуцированная
Здоровые доноры		615,25 (553,50-1014,20)	855,44 (622,90-1352,00) $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	881,38 (659,84-1559,04) $p_1 < 0,05$	1665,83 (662,85-2295,01) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	964,02 (655,98-1533,93) $p_1 < 0,05$	1025,00 (817,32-2140,00) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	645,70 (554,23-987,25) $p_2 < 0,05$	1381,40 (827,20-1640,10) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	641,90 (347,39-1028,00) $p_2 < 0,05$	833,55 (432,64-1794,20) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$

3.8.2. *Продукция IL-5, IL-2 и TNF α эозинофильными гранулоцитами in vitro у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам*

При сравнительной оценке показателей *in vitro* секреции IL-5, IL-2 и TNF α в культуре эозинофильных гранулоцитов у больных ТЛ с учетом лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП было зарегистрировано достоверное повышение базальных и VCG-индуцированных уровней продукции IL-5 и TNF α у больных как ЛЧ ТЛ, так и ЛУ ТЛ, сопровождающимся эозинофилией. При этом у пациентов с ИТЛ, выделяющих лекарственно-резистентные штаммы МБТ, в сочетании с эозинофилией крови, средние значения базальной секреции TNF- α в 1,6 раза превышали таковые у больных ЛЧ ИТЛ (табл. 34, 36).

У больных ДТЛ с эозинофилией (независимо от чувствительности МБТ к ПТП) установлено увеличение продукции IL-2 в интактной культуре клеток, тогда как при ЛЧ ТЛ и ЛУ ИТЛ, сопровождающихся эозинофилией, отмечалась *in vitro* гипосекреция IL-2 эозинофильными гранулоцитами. У больных ЛУ ТЛ без эозинофилии показатели спонтанной и VCG-индуцированной секреции IL-2 соответствовали аналогичным параметрам у здоровых доноров и пациентов с лекарственно-чувствительным вариантом инфекции (табл. 35).

Таким образом, при ТЛ, сопровождающемся эозинофилией, лейкоциты эозинофильного ряда характеризуются высокой активностью в отношении секреции ключевых медиаторов, регулирующих клеточный и гуморальный иммунный ответ.

Таблица 34

Содержание IL-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – BCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		6,22 (3,13-10,75)	
		9,15 (4,51-12,61) p ₅ <0,05	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инfiltrативный	14,91 (12,84-19,00) p ₁ <0,05	15,12 (12,71-18,98) p ₁ <0,05
		23,80 (22,14-30,00) p ₁ <0,05	35,73 (25,23-36,00) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	13,93 (12,13-16,74) p ₁ <0,05	19,44 (14,12-20,20) p ₁ <0,05
		26,23 (25,03-27,73) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	25,73 (24,80-27,60) p ₁ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инfiltrативный	5,59 (2,31-9,80) p ₂ <0,05	5,32 (1,94-8,13) p ₂ <0,05
		5,37 (2,12-7,32) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	4,92 (1,91-7,11) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
	Диссеминированный	6,00 (3,20-10,17) p ₂ <0,05	4,93 (2,52-8,50) p ₂ <0,05
		5,68 (2,94-8,52) p ₂ <0,05	5,79 (3,11-8,74) p ₂ <0,05

Примечание. Здесь и в табл. 35, 36: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p₂ – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p₃ – у больных инfiltrативным туберкулезом

легких; p_4 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; p_5 – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Таблица 35

Содержание IL-2 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – VCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		52,29 (24,45-69,50)	
		57,35 (30,70-65,76)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	32,38 (18,38-54,84) $p_1 < 0,05$	40,05 (32,76-42,75) $p_1 < 0,05$
		36,45 (29,77-40,95) $p_1 < 0,05$	38,85 (25,39-40,06) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	74,17 (40,10-80,14) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	75,96 (41,75-79,14) $p_1 < 0,05$
		71,25 (58,47-77,34)	73,18 (22,50-80,06)
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	53,10 (46,23-74,74) $p_2 < 0,05$	46,95 (30,13-61,07) $p_2 < 0,05$
		46,55 (24,59-57,03) $p_1 < 0,05$	40,51 (24,93-60,62) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	54,85 (43,32-65,21) $p_2 < 0,05$	50,85 (37,49-71,37) $p_3 < 0,05$
		49,88 (39,50-57,49) $p_2 < 0,05$	52,74 (40,14-57,83) $p_2 < 0,05$

Содержание TNF α в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – BCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		615,25 (553,50-1014,20)	
		855,40 (622,90-1352,00) p ₅ <0,05	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	819,03 (662,73-1429,94) p ₁ <0,05	1279,32 (892,24-1558,90) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05
		1729,00 (670,15-2103,32) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	2101,50 (729,37-2249,01) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	769,50 (655,94-1233,96) p ₁ <0,05	973,20 (656,00-1482,00) p ₁ <0,05
		1115,20 (893,72-2008,78) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	1253,29 (907,92-1940,60) p ₁ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	619,90 (554,98-757,03) p ₂ <0,05	743,90 (614,23-947,65) p ₂ <0,05
		1319,00 (896,02-1600,00) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₅ <0,05	1282,03 (920,29-1530,10) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	657,55 (351,90-1012,00)	1007,50 (739,74-1027,80) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
		1353,29 (928,04-1692,70) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	1175,35 (882,18-1793,90) p ₁ <0,05

3.9. Показатели иммунного ответа у больных туберкулезом легких

3.9.1. Количественные показатели лейкоцитарного звена у больных туберкулезом легких

При исследовании количественных показателей лейкоцитарного звена у больных ТЛ было установлено повышение общего количества лейкоцитов в крови по сравнению с таковым у здоровых доноров (табл. 37).

Таблица 37

Общее количество лейкоцитов и содержание лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц		Общее количество лейкоцитов, ($\times 10^9/\text{л}$)	Содержание лимфоцитов	
			%	$\times 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры		5,61 \pm 0,35	33,54 \pm 5,29	1,88 \pm 0,03
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	9,94 \pm 0,56 $p_1 < 0,05$	35,15 \pm 7,29	3,49 \pm 1,75 $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	11,66 \pm 0,49 $p_1 < 0,05$	19,23 \pm 7,01 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	2,24 \pm 1,06 $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	9,83 \pm 1,52 $p_1 < 0,05$	24,78 \pm 6,23 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	2,43 \pm 0,98 $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	10,26 \pm 0,56 $p_1 < 0,05$	16,32 \pm 5,19 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	1,60 \pm 0,75 $p_3 < 0,05$

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.

Наиболее выраженный лейкоцитоз регистрировался при ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией. У всех обследованных больных ТЛ (за исключением ИТЛ с эозинофилией) отмечалась относительная лимфоцитопения. Абсолютное количество лимфоцитов у пациентов с ИТЛ, сопровождающимся

эозинофилией, напротив, превышало аналогичный параметр у здоровых доноров и больных ТЛ без эозинофилии (табл. 37).

Анализ параметров лейкоцитарного звена у больных ТЛ в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя к ПТП показал, что наиболее выраженный лейкоцитоз обнаруживался при ЛЧ ДТЛ с эозинофилией (табл. 38).

У больных ДТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови и пациентов с ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии вне зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП установлено статистически значимое снижение относительного количества лимфоцитов в крови по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (табл. 39).

Таблица 38

Общее количество лейкоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам ($\times 10^9/\text{л}$) ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		5,61±0,35	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	10,88±2,32 $p_1 < 0,05$	11,85±1,94 $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	12,00±1,93 $p_1 < 0,05$	10,30±0,80 $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	9,97±3,36 $p_1 < 0,05$	7,80±2,05 $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	10,80±2,66 $p_1 < 0,05$	9,57±1,38 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание: Здесь и в табл. 39: 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 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

Таблица 39

Содержание лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц			Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		%	33,54±5,29	
		×10 ⁹ /л	1,88±0,03	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	%	32,34±6,11	31,84±5,93
		×10 ⁹ /л	3,52±1,60 p ₁ <0,05	3,77±1,09 p ₁ <0,05
	Диссеминированный	%	20,03±6,57	18,95±7,03

в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным

				$p_3 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	$2,40 \pm 1,02$	$2,27 \pm 1,13$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	%	$26,23 \pm 4,85$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$24,50 \pm 5,19$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	$2,61 \pm 0,86$ $p_2 < 0,05$	$1,91 \pm 0,74$ $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	%	$18,12 \pm 4,89$ $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	$19,42 \pm 5,03$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	$1,96 \pm 0,95$ $p_3 < 0,05$	$1,86 \pm 0,51$

препаратам (%) (Ме (Q₁-Q₃))

При этом абсолютное число лимфоцитов в крови пациентов данных групп значимо не отличалось от контрольных значений (табл. 39). Обращало на себя внимание увеличение абсолютного содержания лимфоцитов при ЛЧ ИТЛ без эозинофилии по сравнению с таковым при лекарственно-устойчивом варианте ИТЛ ($p_4 < 0,05$).

3.9.2. Содержание CD3⁺, CD20⁺ лимфоцитов и IFN γ в крови у больных туберкулезом легких

Исследование содержания CD3⁺ Т-лимфоцитов при ТЛ позволило констатировать статистически значимое снижение (по сравнению с контрольными значениями) относительного их числа в периферической крови у всех больных ТЛ. В группе больных ИТЛ (с эозинофилией и без таковой) абсолютное содержание Т-лимфоцитов в крови соответствовало норме (табл. 40).

Таблица 40

Содержание CD3⁺ и CD20⁺ лимфоцитов в периферической крови в зависимости от формы заболевания у больных туберкулезом легких ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц		CD3 ⁺ Т-лимфоциты	CD20 ⁺ В-лимфоциты
	%	$71,08 \pm 5,08$	$7,13 \pm 3,07$

		$\times 10^9/\text{л}$	1,34 \pm 0,15	0,13 \pm 0,01
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	%	43,14 \pm 3,76 $p_1 < 0,05$	17,09 \pm 4,12 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	1,51 \pm 0,21	0,59 \pm 0,09 $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	%	40,93 \pm 3,84 $p_1 < 0,05$	23,67 \pm 7,02 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	0,92 \pm 0,19 $p_1 < 0,05$	0,53 \pm 0,09 $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	%	49,18 \pm 2,81 $p_1 < 0,05$	18,33 \pm 2,96 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	1,19 \pm 0,34	0,22 \pm 0,10 $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	%	51,43 \pm 5,15 $p_1 < 0,05$	19,34 \pm 3,22 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	0,82 \pm 0,41 $p_1 < 0,05$	0,16 \pm 0,07 $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 43: 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.

При оценке количества Т-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП было установлено достоверное снижение абсолютного числа $CD3^+$ экспрессирующих клеток при ЛУ ИТЛ без эозинофилии по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров и больных ЛЧ ИТЛ без эозинофилии. В свою очередь, у пациентов с ЛУ ДТЛ в сочетании с эозинофилией крови абсолютное содержание Т-лимфоцитов оказалось в 1,7 раза ниже такового при инфильтративной форме ЛУ ТЛ с эозинофилией (табл. 41).

Таблица 41

Содержание $CD3^+$ Т-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным

препаратам ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый	
Здоровые доноры	%	71,08±5,08		
	×10 ⁹ /л	1,34±0,15		
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	%	44,63±1,84 p ₁ <0,05	42,28±3,15 p ₁ <0,05
		×10 ⁹ /л	1,57±0,14	1,59±0,12
	Диссеминированный	%	41,05±3,63 p ₁ <0,05	42,13±3,24 p ₁ <0,05
		×10 ⁹ /л	1,00±0,07	0,96±0,06 p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	%	48,38±1,93 p ₁ <0,05	49,00±2,11 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
		×10 ⁹ /л	1,26±0,05	0,94±0,15 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₄ <0,05
	Диссеминированный	%	50,64±4,65 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	51,04±5,12 p ₁ <0,05 p ₂ <0,05
		×10 ⁹ /л	0,99±0,02	0,95±0,10 p ₁ <0,05

Примечание. Здесь и в табл. 42, 44: 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 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

На фоне снижения числа CD3⁺ Т-лимфоцитов нами было зарегистрировано достоверное повышение относительного и абсолютного числа CD20-презентирующих В-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ с эозинофилией независимо от формы заболевания (табл. 40). У пациентов с ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии было зарегистрировано повышение лишь относительного числа CD20⁺ В-лимфоцитов, в то время как абсолютное их количество сохранялось в пределах нормы (табл. 42).

Таблица 42

Содержание CD20⁺ В-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких

в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам ($\bar{X} \pm m$)

Примечательно, что у больных ИТЛ и ДТЛ в сочетании с эозинофилией крови содержание CD20-положительных лимфоцитов в 2,7 и 3,3 раза соответственно превышало аналогичные параметры у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии. Статистически значимых различий между относительным и абсолютным числом CD20⁺ В-лимфоцитов у больных ТЛ в зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП (с эозинофилией и без таковой) выявлено не было (табл. 42).

При исследовании содержания IFN γ в крови у больных ТЛ было зарегистрировано достоверное снижение данного показателя у пациентов с ТЛ,

Группы обследованных лиц			Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		%	7,13 \pm 3,07	
		$\times 10^9/\text{л}$	0,13 \pm 0,01	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	%	17,34 \pm 3,00 $p_1 < 0,05$	18,01 \pm 2,42 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	0,61 \pm 0,02 $p_1 < 0,05$	0,68 \pm 0,01 $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	%	22,85 \pm 6,29 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	23,03 \pm 6,54 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	0,55 \pm 0,07 $p_1 < 0,05$	0,52 \pm 0,08 $p_1 < 0,05$ $p_3 > 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	%	20,00 \pm 1,16 $p_1 < 0,05$	19,84 \pm 1,99 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	0,20 \pm 0,05 $p_2 < 0,05$	0,23 \pm 0,06 $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	%	21,03 \pm 1,92 $p_1 < 0,05$	19,93 \pm 3,17 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9/\text{л}$	0,19 \pm 0,11 $p_2 < 0,05$	0,17 \pm 0,10 $p_2 < 0,05$

сопровождающимся эозинофилией. У больных с туберкулезной инфекцией без эозинофилии, как при ИТЛ, так и при ДТЛ, изучаемый параметр не отличался от контрольных значений (табл. 43).

Содержание IFN γ в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IFN γ
Здоровые доноры		8,78 (5,57-10,41)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	5,85 (3,86-7,31) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	4,95 (3,86-6,21) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	7,37 (6,80-10,97)
	Диссеминированный	10,07 (8,80-11,54) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

У пациентов с ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, уровень IFN γ в крови оказался ниже такового у больных ТЛ без эозинофилии и в случае диссеминированной формы заболевания имел достоверные различия ($p_2 < 0,05$). При сравнении содержания данного цитокина в крови у больных ТЛ в зависимости от формы заболевания наиболее высокий его уровень был зарегистрирован у пациентов с ДТЛ без эозинофилии по сравнению с соответствующим параметром у больных ДТЛ с эозинофилией ($p_2 < 0,05$) и ИТЛ без эозинофилии ($p_3 < 0,05$).

Аналогичная закономерность была выявлена при сравнении содержания IFN γ в крови больных ТЛ в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП (табл. 44). У пациентов с ЛЧ ТЛ и ЛУ ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, уровень исследуемого медиатора оказался ниже аналогичного показателя у здоровых доноров и больных ТЛ без эозинофилии. У больных ЛУ ДТЛ без эозинофилии концентрация IFN γ в крови в 1,3 и 2,7 раза, соответственно, превышала средние значения данного параметра при ЛЧ ДТЛ без эозинофилии и ЛУ ДТЛ с эозинофилией.

Содержание IFN γ в крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		8,78 (5,57-9,41)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	5,13 (4,06-6,00) $p_1 < 0,05$	4,68 (3,89-5,93) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	4,19 (3,98-7,03) $p_1 < 0,05$	4,40 (3,95-5,75) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	7,67 (6,80-10,43) $p_2 < 0,05$	8,14 (5,45-9,03) $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	9,04 (7,02-11,29) $p_2 < 0,05$	11,88 (9,81-13,00) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$

В результате проведенного нами корреляционного анализа было установлено наличие отрицательной зависимости между содержанием IFN γ и количеством эозинофильных гранулоцитов в крови при ИТЛ ($r = -0,69$, $p < 0,05$) и ДТЛ ($r = -0,74$, $p < 0,05$).

3.9.3. Показатели *in vitro* секреции IL-2, IL-4, IL-10 и TGF β мононуклеарными лейкоцитами крови у больных туберкулезом легких

3.9.3.1. Содержание IL-2, IL-4, IL-10 и TGF β в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от наличия эозинофилии и клинической формы заболевания

При ТЛ было зарегистрировано статистически значимое снижение (относительно контрольных значений) базальной продукции IL-2 *in vitro* только у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 46).

Таблица 45

Содержание IL-2 и IL-4 в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		IL-2		IL-4	
		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) $p_4 < 0,05$
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) $p_1 < 0,05$
	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) $p_1 < 0,05$
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) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	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) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 46: 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, ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких, ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких.

Наиболее выраженное ее снижение отмечалось в группе больных ДТЛ (в 2,1 раза по сравнению с контрольными величинами и в 1,4 раза - с соответствующими значениями при инфильтративной форме инфекции) (табл. 45).

Добавление вакцинного штамма BCG в культуры клеток у больных ТЛ вне зависимости от наличия эозинофилии и клинической формы заболевания характеризовалось более низкой относительно нормы продукцией IL-2. При этом у больных ИТЛ и ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, BCG-индуцированная секреция цитокина достоверно превышала таковую при ТЛ без эозинофилии ($p_2 < 0,05$). При сравнении с базальным уровнем индуцированная продукция IL-2 оказалась повышенной только у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 45).

При исследовании содержания IL-4 в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* уровень его оказался повышенным как у больных ТЛ с эозинофилией (при инфильтративной и диссеминированной формах), так и у больных ТЛ без эозинофилии (при диссеминированной форме), что указывает на отсутствие зависимости данного показателя от количества эозинофилов в периферической крови и формы заболевания. В свою очередь, при ИТЛ без эозинофилии базальная секреция исследуемого цитокина соответствовала контрольным значениям (табл. 45).

Продукция IL-4 при индукции клеток *in vitro* вакцинным штаммом BCG у всех пациентов с ТЛ достоверно превышала соответствующие параметры у здоровых доноров. Исключение составила группа пациентов с ИТЛ без эозинофилии, у которых индуцированная секреция IL-4 была ниже относительно нормы и уровня базальной секреции цитокина. Индекс стимуляции продукции IL-4 у здоровых доноров был равен 1,01 усл. ед., у всех больных ТЛ независимо от наличия эозинофилии и формы заболевания величина этого показателя соответствовала контролю (табл. 45).

Анализ спонтанной продукции IL-10 мононуклеарами крови *in vitro* при ТЛ позволил выявить достоверные изменения показателя только у больных инфильтративной формой инфекции без эозинофилии: уровень секреции IL-10 оказался в 2 раза выше, чем в контрольной группе. У пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, напротив, отмечалась тенденция к снижению базальной секреции медиатора, однако статистически значимых различий выявлено не было (табл. 46).

Таблица 46

Содержание IL-10 и TGFβ в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* больных туберкулезом легких в зависимости от наличия эозинофилии и формы заболевания (пг/мл) Me (Q₁-Q₃)

Группы обследованных лиц	IL-10		TGFβ	
	Интактная	BCG-индуцированная	Интактная	BCG-индуцированная

Здоровые доноры		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	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	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	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	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) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$

На фоне индукции клеток культуральной суспензии вакцинным штаммом BCG достоверное увеличение продукции IL-10 относительно нормы было зарегистрировано у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией и у пациентов с ИТЛ без эозинофилии. В случае ДТЛ без эозинофилии индуцированная секреция IL-10 оказалась в 1,4 раза ниже базальной продукции медиатора и сопоставимой с таковой у здоровых доноров. Обращало на себя внимание также то, что при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, BCG-индуцированная секреция указанного медиатора вдвое превышала аналогичный параметр в интактной культуре клеток (табл. 46). Что касается TGF β , то в группах больных ТЛ имелись выраженные различия в продукции данного цитокина *in vitro* (табл. 46). Так, при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, независимо от формы заболевания, регистрировалось достоверное увеличение (по сравнению с контролем) секреции TGF β в интактной культуре клеток. У больных ТЛ без эозинофилии отмечалась противоположная картина: при инфильтративной форме ТЛ обнаруживалось снижение продукции TGF β в то время как у больных ДТЛ базальный уровень медиатора не отличался от продукции TGF β у здоровых лиц.

Следует отметить, что у больных ТЛ с эозинофилией спонтанная секреция TGF β *in vitro* достоверно превышала аналогичный показатель у больных ТЛ без эозинофилии ($p_2 < 0,05$).

При добавлении к культуре клеток вакцинного штамма BCG у больных ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, установлено выраженное снижение секреции TGF β по сравнению с таковой у здоровых доноров и базальным уровнем продукции цитокина. При ДТЛ, ассоциированном с эозинофилией, уровень BCG-индуцированной секреции TGF β достоверно превышал соответствующий параметр у больных ИТЛ с эозинофилией, однако не отличался от уровня спонтанной секреции указанного медиатора. Уровень продукции TGF β у больных ТЛ без эозинофилии оказался сниженным при диссеминированной форме инфекции в сравнении с контрольными значениями, соответствующими показателями у больных ИТЛ и базальным уровнем секреции цитокина ($p_1, p_3, p_4 < 0,05$) (табл. 46).

В ходе корреляционного анализа была установлена достоверная связь между абсолютным числом эозинофильных гранулоцитов в крови и содержанием TGF β в интактной культуре мононуклеарных клеток при ИТЛ ($r=0,79, p < 0,05$) и базальным уровнем секреции IL-2 при ДТЛ ($r=-0,63, p < 0,01$).

3.9.3.2. Содержание IL-2, IL-4, IL-10 и TGF β в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам

У пациентов с ЛЧ и ЛУ ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови, вне зависимости от формы заболевания регистрировалось снижение базальной и BCG-индуцированной секреции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro*. Наиболее выраженное снижение базальной продукции этого цитокина было зарегистрировано у больных с ЛЧ ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, в сравнении с инфильтративной формой ЛЧ ТЛ ($p_3 < 0,05$) (табл. 47).

При сравнительной оценке базальной секреции IL-2 у больных ТЛ в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП статистически значимых ее различий выявлено не было ($p_4 > 0,05$) (табл. 47).

Обнаружено достоверное снижение индуцированной продукции IL-2 при лекарственно-чувствительном ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией и ИТЛ без эозинофилии по сравнению с аналогичными параметрами при лекарственно-резистентном варианте заболевания ($p_4 < 0,05$). В то же время при ЛЧ ДТЛ без эозинофилии VCG-индуцированный уровень секреции IL-2 в 1,8 раза превышал таковой при ЛУ ДТЛ (табл. 47).

Уровень спонтанной продукции IL-4 вне зависимости от лекарственной чувствительности МБТ к ПТП оказался повышенным у больных ТЛ с эозинофилией и пациентов с ДТЛ без эозинофилии (табл. 48). При действии VCG уровень секреции IL-4 достоверно превышал контрольные значения лишь у больных ДТЛ (с эозинофилией и без нее), выделяющих как лекарственно-чувствительные, так и лекарственно-устойчивые штаммы МБТ. Продукция IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* во всех группах больных ТЛ не зависела от чувствительности возбудителя к ПТП ($p_4 > 0,05$) (табл. 48).

У всех больных ЛЧ ТЛ и ЛУ ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, базальный уровень секреции IL-10 оставался в пределах контрольных значений. Значение VCG-индуцированной секреции данного медиатора у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, также не зависело от чувствительности МБТ к ПТП. Однако при ЛЧ ИТЛ без эозинофилии уровень спонтанной и VCG-индуцированной *in vitro* продукции IL-10 в 1,7 и 2,3 раза соответственно превышал таковой у больных ЛУ ИТЛ, в крови которых количество эозинофилов соответствовало норме. У больных ДТЛ без эозинофилии вне зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП спонтанная и индуцированная секреция указанного цитокина соответствовала норме (табл. 49).

Таблица 47

Содержание IL-2 в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – BCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		22,26 (10,82-30,18)	
		69,36 (13,94-165,80) p ₅ <0,05	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	13,78 (10,56-19,54) p ₁ <0,05	14,39 (11,06-19,74) p ₁ <0,05
		30,54 (26,38-59,28) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	42,53 (29,38-60,69) p ₁ <0,05 p ₄ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	9,04 (6,90-14,00) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	10,00 (7,45-13,50) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05
		23,28 (18,06-44,80) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	30,45 (17,48-50,76) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05 p ₄ <0,05 p ₅ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	19,24 (13,63-32,48)	20,42 (10,28-25,73)
		13,82 (5,28-30,21) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05	26,83 (11,15-33,32) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₄ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	29,72 (12,72-53,59) p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	21,32 (9,73-24,49) p ₁ <0,05
		27,18 (11,33-42,86) p ₁ <0,05	15,53 (9,79-22,85) p ₁ <0,05 p ₂ <0,05 p ₄ <0,05

Примечание. Здесь и в табл. 48, 49, 50: 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; p_4 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких; p_5 – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Таблица 48

Содержание IL-4 в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – BCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		39,98 (21,14-55,04)	
		43,69 (26,46-68,55)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	57,13 (35,72-78,41) $p_1 < 0,05$	62,36 (37,11-79,45) $p_1 < 0,05$
		45,64 (32,04-60,00)	39,23 (35,65-56,32)
	Диссеминированный	56,39 (24,14-70,63) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	52,24 (23,55-66,23) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
		60,47 (40,11-78,49) $p_1 < 0,05$	59,92 (41,34-77,39) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	30,54 (16,30-51,42) $p_2 < 0,05$	36,29 (17,18-47,53) $p_2 < 0,05$
		29,15 (19,55-52,42) $p_2 < 0,05$	35,82 (20,22-54,61) $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	38,32 (39,94-74,81) $p_2 < 0,05$	60,73 (41,15-72,39) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
		59,13 (44,37-75,12) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	51,74 (44,79-59,72) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Таблица 49

Содержание IL-10 в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – BCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		25,29 (13,50-33,56)	
		26,21 (22,74-60,22)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	20,91 (14,07-29,24)	22,56 (13,70-29,89)
		43,17 (32,73-61,28) $p_1 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	42,98 (31,63-63,15) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	19,00 (16,740-24,71)	20,37 (17,29-25,12)
		46,81 (23,90-70,52) $p_1 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	44,93 (25,18-69,30) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	44,92 (18,75-57,64) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	27,51 (24,18-42,71) $p_4 < 0,05$
		55,49 (32,22-65,28) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	24,51 (25,62-53,21) $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	24,11 (9,54-50,72) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	20,07 (18,22-21,13)
		33,52 (20,64-66,17) $p_3 < 0,05$ $p_5 < 0,05$	26,52 (23,57-35,24) $p_2 < 0,05$

При исследовании секреции TGF β мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* было зарегистрировано достоверное увеличение базальной продукции цитокина при лекарственно-чувствительным варианте ИТЛ и ДТЛ и лекарственно-резистентном ДТЛ, сопровождающихся эозинофилией, по сравнению с контрольными значениями (табл. 50). Среди больных ЛЧ ТЛ с эозинофилией данный параметр претерпевал статистически значимые различия в зависимости от клинической формы заболевания ($p_3 < 0,05$). В сравнении с группой больных ЛУ ТЛ уровень спонтанной секреции TGF β оказался повышенным при ЛЧ ИТЛ с эозинофилией и был ниже аналогичного показателя при ЛЧ ДТЛ (табл. 50).

Вне зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП при ТЛ, ассоциированном с эозинофилией, регистрировалось снижение BCG-индуцированной секреции TGF β у больных с инфильтративным ТЛ и увеличение секреции данного цитокина у больных с диссеминированным ТЛ относительно нормы. При ЛУ ИТЛ без эозинофилии отмечалось достоверное снижение базальной и индуцированной продукции TGF β по сравнению с таковой у больных с лекарственно-чувствительным вариантом инфекции. Обращало на себя внимание максимальное увеличение BCG-индуцированной секреции TGF β относительно контрольных значений у больных ДТЛ без эозинофилии, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы МБТ (табл. 50).

3.9.4. Содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих Foxp3, в периферической крови у больных туберкулезом легких

По происхождению регуляторные Т-клетки (Treg) классифицируют на естественные тимические Treg-лимфоциты и индуцированные на периферии [Liston A. et al., 2008; Lee D.C. et al., 2010; Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. Естественные Treg имеют фенотип CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, а индуцированные несут в комплексе молекулы CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ [Ярилин А.А., Донецкова А.Д., 2006; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011].

В ходе настоящего исследования мы оценивали две популяции CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т-лимфоцитов, поскольку только Foxp3-экспрессирующие Трег-клетки обладают супрессорной активностью.

Таблица 50

Содержание TGFβ в культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro* у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (в числителе – интактная, в знаменателе – BCG-индуцированная) (пг/мл) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		1108,75 (929,80-1487,20)	
		1087,80 (500,00-1412,60)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	1299,03 (840,59-1327,78) p ₁ <0,05	1001,60 (630,74-1103,00)
		627,50 (553,50-731,71) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	652,10 (545,91-743,06) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	1421,31 (769,45-2140,73) p ₁ <0,05 p ₃ <0,05	1632,12 (774,90-2005,78) p ₁ <0,05; p ₃ <0,05 p ₄ <0,05
		1267,83 (771,45-1663,00) p ₁ <0,05 p ₅ <0,05	1365,48 (829,40-1748,22) p ₁ <0,05; p ₃ <0,05 p ₅ <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	1062,91 (792,24-1613,57) p ₂ <0,05	578,02 (315,29-781,46) p ₁ <0,05; p ₂ <0,05 p ₄ <0,05
		1125,92 (875,16-1215,07) p ₂ <0,05	752,17 (495,32-991,45) p ₁ <0,05; p ₄ <0,05 p ₅ <0,05
	Диссеминированный	923,62 (728,24-1427,19) p ₂ <0,05 p ₃ <0,05	1072,33 (915,61-2452,27) p ₂ <0,05 p ₃ <0,05

		873,18 (571,11-1031,92) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	1986,58 (792,53-3009,68) $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$; $p_4 < 0,05$ $p_5 < 0,05$
--	--	--	---

Исследование содержания Treg с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ позволило констатировать статистически значимое увеличение их числа в периферической крови (по сравнению с контрольными значениями) у всех больных ТЛ независимо от числа эозинофильных гранулоцитов в крови (табл. 51). Однако в группе больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, содержание $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов превышало аналогичные параметры у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии в 2,4 и 2,6 раза соответственно. При этом достоверные различия данного показателя в зависимости от формы заболевания у больных ТЛ

Группы обследованных лиц	$CD4^+CD25^+Foxp3^+$	$CD4^+CD25^-Foxp3^+$
Здоровые доноры	2,63 (2,00-3,29)	5,12 (4,76-9,75)

отсутствовали (табл. 51).

Таблица 51

Содержание регуляторных Т-клеток, экспрессирующих *Foxp3*, в периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от формы заболевания
(%) (Me (Q₁-Q₃))

Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	6,28 (4,02-9,00) $p_1 < 0,05$	6,15 (3,03-12,02)
	Диссеминированный	6,72 (3,92-11,56) $p_1 < 0,05$	5,81 (3,49-10,59)
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	4,48 (3,10-6,00) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	6,95 (5,50-11,20)
	Диссеминированный	5,35 (3,75-7,14) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	6,30 (5,50-8,00)

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

При анализе содержания $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ лимфоцитов в крови в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП были выявлены достоверные различия. У больных ЛУ ДТЛ с эозинофилией данный параметр достоверно превышал не только аналогичные контрольные величины, но и показатели в группе больных лекарственно-чувствительным вариантом ДТЛ с эозинофилией (табл. 52). Содержание $CD25$ -негативных регуляторных Т-клеток, экспрессирующих молекулу $Foxp3$, в крови у всех обследованных больных ТЛ соответствовало контрольным значениям. Достоверное увеличение числа $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Т-лимфоцитов в крови было зарегистрировано лишь у пациентов с ЛУ ДТЛ без эозинофилии по сравнению с соответствующим показателем у здоровых доноров (табл. 53).

Таблица 52

Содержание $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регуляторных Т-клеток периферической крови у больных туберкулезом в зависимости от чувствительности возбудителя к противотуберкулезным препаратам (%) (Me (Q_1 - Q_3))

Примечание. Здесь и в табл. 53: 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 – у больных лекарственно-чувствительным туберкулезом легких.

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		2,63 (2,00-3,29)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	5,93 (5,11-8,00) $p_1 < 0,05$	6,83 (5,21-8,24) $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	5,67 (4,56-8,20) $p_1 < 0,05$	7,04 (6,78-11,48) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	3,66 (2,00-7,15) $p_2 < 0,05$	3,98 (1,95-6,85) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	4,66 (4,02-5,48) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	5,25 (2,78-6,00) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Таблица 53

Содержание CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ регуляторных Т-клеток периферической крови у больных туберкулезом легких в зависимости от чувствительности возбудителя к

Группы обследованных лиц		Лекарственно-чувствительный	Лекарственно-устойчивый
Здоровые доноры		5,12 (4,76-9,75)	
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	6,06 (4,70-8,34)	6,25 (4,94-13,02)
	Диссеминированный	5,76 (3,00-5,99)	5,36 (3,29-6,04)
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	5,00 (3,04-6,95) p ₂ <0,05	4,62 (3,54-7,00) p ₂ <0,05
	Диссеминированный	6,00 (5,79-7,14) p ₃ <0,05	6,75 (5,95-7,43) p ₁ <0,05

противотуберкулезным препаратам (%) Me (Q₁-Q₃)

3.9.5. Содержание противотуберкулезных антител в крови у больных туберкулезом легких

В ходе анализа суммарного содержания специфичных к антигенам микобактерий иммуноглобулинов класса G, M и A в крови у обследованных лиц было установлено, что антитела к антигенам *M. tuberculosis* выявлялись у части больных ТЛ, тогда как в группе здоровых доноров противотуберкулезных антител (ПТАТ) обнаружено не было (в 100 % случаев). При этом положительный результат на наличие противотуберкулезных антител в крови у больных ТЛ с эозинофилией (40,00±6,54 %) и без таковой (31,03±10,13 %) встречался с сопоставимой частотой. Отсутствовала взаимосвязь между наличием антител и клинической формой заболевания внутри каждой группы больных ТЛ (табл. 54). Наряду с этим, достоверных различий по наличию ПТАТ в крови в группах

больных ЛЧ ТЛ и ЛУ ТЛ (т.е. в зависимости от чувствительности возбудителя к ПТП) не было установлено. Так, суммарные ПТАТ выявлялись при ТЛ с эозинофилией: у $31,30 \pm 8,55$ % больных ЛЧ ИТЛ и $29,50 \pm 13,55$ % - ЛУ ИТЛ; у $42,00 \pm 11,03$ % и $37,50 \pm 10,85$ % больных ЛЧ ДТЛ и ЛУ ДТЛ соответственно полученные результаты не имели статистически значимых различий.

Таблица 54

Противотуберкулезные антитела в крови у больных туберкулезом легких

Группы обследованных лиц		Количество больных с наличием ПТАТ в крови, %
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	$34,05 \pm 8,10$
	Диссеминированный	$40,29 \pm 10,99$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	$33,30 \pm 12,59$
	Диссеминированный	$44,11 \pm 10,23$

Таким образом, у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП были зарегистрированы лейкоцитоз, относительная лимфоцитопения, а также дефицит $CD3^+$ Т-лимфоцитов в периферической крови на фоне увеличения относительного содержания В-клеток, несущих CD20-маркер. При этом ТЛ, ассоциированный с эозинофилией, характеризовался достоверным снижением сывороточной концентрации $IFN\gamma$, гипосекрецией IL-2 на фоне увеличения продукции $TGF\beta$ мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* в сочетании с повышением абсолютного содержания $CD20^+$ В-лимфоцитов и $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg в крови.

3.10. Клинико-рентгенологические показатели у больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией

При оценке клинических проявлений у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови, субфебрильная температура тела регистрировалась у $30,29 \pm 2,96$ % пациентов, фебрильная температура – у $54,28 \pm 4,91$ %, в то время как

при ТЛ без эозинофилии субфебрильная и фебрильная температурные реакции обнаруживались в равном соотношении (выявленные различия показателей не достигали статистически значимого уровня). Такие клинические проявления ТЛ, как слабость и повышенная утомляемость, регистрировались у $100,00 \pm 0,00$ % пациентов независимо от наличия эозинофильной реакции крови. Сравнительный анализ других результатов объективного обследования (потеря аппетита, дефицит массы тела) указывал на присутствие данных симптомов у каждого второго-третьего пациента в группах больных ТЛ с эозинофилией и без таковой (табл. 55).

Таблица 55

Клиническая характеристика обследованных больных туберкулезом легких (%)

Симптомы		Больные туберкулезом легких	
		С эозинофилией (n=102)	Без эозинофилии (n=115)
Температура тела	нормальная	15,43±3,59	18,57±3,64
	субфебрильная	30,29±2,96	41,05±4,66
	фебрильная	54,28±4,91	40,38±4,60
Повышенная утомляемость		100,00±0,00	100,00± 0,00
Слабость		100,00±0,00	100,00± 0,00
Потеря аппетита		59,80± 3,98	62,60±4,91
Потеря массы тела более 10 кг		70,53±4,38	63,87±4,56
Кашель		90,19±2,96	84,34±3,40
Выделение мокроты		100,00±0,00	93,91±2,24
Кровохарканье		17,65±3,77	18,26±3,62
Одышка	при нагрузке	66,67±4,42	53,91±4,67
	в покое	15,43±3,21	11,34±2,96
Боль в грудной клетке		38,24±4,84	34,78±4,46

Отличительная оценка данных объективного обследования - бронхолегочных симптомов - также не выявила достоверных различий среди пациентов с ТЛ в зависимости от количества эозинофилов в периферической крови. Так, практически у каждого пациента наблюдался кашель с выделением мокроты, приблизительно у одной пятой части больных течение специфического процесса осложнялось кровохарканьем. Осложнения основного заболевания в виде

появления одышки при физической нагрузке регистрировалось в группах больных одинаково: у $66,67 \pm 4,42$ % пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и $53,91 \pm 4,67$ % больных ТЛ без эозинофилии. Доля пациентов с ТЛ, предъявляющих жалобы на одышку в покое и боль в грудной клетке, была также сопоставимой и не различалась в зависимости от наличия эозинофилии крови (табл. 55).

Рентгенологическое обследование больных при поступлении в стационар показало, что распространенность специфического процесса в легких у больных ТЛ была значительной. У пациентов с ТЛ независимо от наличия эозинофилии преобладали поражения более 4-х сегментов в пределах одного легкого. Вовлечение в патологический процесс обоих легких регистрировалось у $42,51 \pm 4,20$ % больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и у $34,43 \pm 3,24$ % больных ТЛ без эозинофилии. При этом видимые очагово-инфильтративные изменения в легочной ткани выявлялись у больных ТЛ как с эозинофилией, так и без эозинофилии (табл. 56).

Таблица 56

Рентгенологические проявления у больных туберкулезом легких (%)

Рентгенологические проявления патологического процесса в легких		Больные туберкулезом легких	
		С эозинофилией (n=102)	Без эозинофилии (n=115)
Площадь поражения	от 2 до 4 сегментов	$8,29 \pm 2,66$	$9,17 \pm 2,76$
	более 4 сегментов в пределах одного легкого	$49,20 \pm 4,60$	$56,40 \pm 4,50$
	оба легких	$42,51 \pm 4,20$	$34,43 \pm 3,24$
Характер образований	очаги	$62,26 \pm 4,80$	$52,60 \pm 4,68$
	инфильтраты	$34,51 \pm 4,74$	$35,13 \pm 4,46$
Деструктивные изменения в легочной ткани		$81,86 \pm 3,79$	$61,29 \pm 4,56$ $p < 0,01$
Темпы рассасывания очагово-инфильтративных образований в легких	быстрый (до 3 мес)	$7,29 \pm 2,50$	$25,57 \pm 4,11$ $p < 0,001$
	средний (3-6 мес)	$33,80 \pm 4,70$	$34,34 \pm 4,43$
	медленный (6 и более мес)	$56,37 \pm 4,93$	$27,38 \pm 4,15$ $p < 0,001$
Остаточные изменения в ткани легких (очаги фиброза)		$47,47 \pm 4,96$	$38,21 \pm 4,46$

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

Несмотря на то, что у всех пациентов отмечался деструктивный процесс в легких, у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, достоверно чаще регистрировались участки деструкции в ткани легких по сравнению с группой больных ТЛ без эозинофилии ($p < 0,01$). Статистически значимые различия были обнаружены при анализе темпов рассасывания очагово-инфильтративных поражений в легких при ТЛ в зависимости от количества эозинофилов в периферической крови. Так, у пациентов ТЛ с эозинофилией преобладали средний и медленный темпы рассасывания очагово-инфильтративных изменений в легочной ткани, тогда как у больных ТЛ без эозинофилии достоверно чаще выявлялись быстрые и средние темпы восстановления ткани легких (табл. 56). Остаточные изменения в ткани легких (очаги фиброза) обнаруживались у всех больных ТЛ вне зависимости от наличия эозинофилии в периферической крови.

В связи с дизайном настоящего исследования, согласно которому больные ТЛ с эозинофилией и без нее были разделены на подгруппы в зависимости от формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП, нами была изучена частота встречаемости инфильтративной и диссеминированной формы инфекции среди больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией и без таковой. Статистический анализ показал, что при ТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови ИТЛ встречался в $60,78 \pm 4,86$ % случаев, а ДТЛ – в $39,32 \pm 4,39$ %, что оказалось сопоставимым с аналогичными параметрами у больных ТЛ без эозинофилии (ИТЛ – у $60,87 \pm 4,57$ % пациентов и ДТЛ – у $39,13 \pm 4,50$ % больных).

При проведении корреляционного анализа с вычислением бисериального коэффициента корреляции взаимосвязи эозинофильной реакции крови с формой заболевания при туберкулезной инфекции обнаружено не было. Однако имелись отличительные особенности рентгенологических проявлений у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой при разделении пациентов по форме заболевания. При ИТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови не было зарегистрировано достоверных различий в отношении обнаружения деструктивных изменений в легочной ткани (табл. 57), а у пациентов с ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, напротив, очаги деструкции регистрировалась в $100,00 \pm 0,00$ % случаев по сравнению с аналогичными параметрами у больных ТЛ без

эозинофилии (табл. 58).

Таблица 57

Рентгенологические проявления
у больных инфильтративным туберкулезом легких (%)

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

По результатам сравнительного анализа деструктивных изменений в ткани легких 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).

При оценке темпов рассасывания очагово-инфильтративных поражений в легочной ткани было показано, что при ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, преобладали средние темпы рассасывания, а при ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, в 100,00±0,00 % случаев регистрировались медленные темпы восстановления легочной ткани по сравнению с соответствующими параметрами при ТЛ без эозинофилии (табл. 57, 58). При этом у пациентов с ИТЛ без эозинофилии достоверно чаще регистрировались быстрые темпы рассасывания очагово-инфильтративных изменений в легких, а у больных ДТЛ без эозинофилии

- медленные темпы восстановления. В ходе корреляционного анализа была установлена достоверная взаимосвязь между средними и медленными темпами рассасывания очагово-инфильтративных образований и эозинофильной реакцией крови при ИТЛ ($r_a=0,66$, $p<0,05$) и ДТЛ ($r_a=0,87$, $p<0,01$) соответственно. Фиброзные изменения в ткани легких обнаруживались практически у каждого второго пациента с ИТЛ и ДТЛ вне зависимости от наличия эозинофильной реакции крови.

Таблица 58

Рентгенологические проявления
у больных диссеминированным туберкулезом легких (%)

Рентгенологические проявления патологического процесса в легких		Больные диссеминированным туберкулезом легких	
		С эозинофилией (n=40)	Без эозинофилии (n=45)
Площадь поражения	от 2 до 4 сегментов	7,00±2,64	12,50±4,67
	более 4 сегментов в пределах одного легкого	25,33±6,96	40,16±4,62
	оба легких	67,51±6,43	47,34±4,24 $p<0,05$
Характер образований	очаги	67,74±7,48	62,50±7,75
	инфильтраты	32,26±3,27	37,50±4,63
Деструктивные изменения в легочной ткани		100,00±0,00	60,35±7,37 $p<0,001$
Темпы рассасывания очагово-инфильтративных образований в легких	быстрый (до 3 мес)	0,00±0,00	25,00±6,52 $p<0,001$
	средний (3-6 мес)	0,00±0,00	12,50 ±5,58 $p<0,001$
	медленный (6 и более мес)	100,00±0,00	62,5±7,30 $p<0,001$
Остаточные изменения в ткани легких (очаги фиброза)		48,43±7,56	50,06 ±7,53

Сравнительный анализ частоты встречаемости ЛУ ТЛ и ЛЧ ТЛ среди обследованных нами пациентов показал, что доля больных, выделяющих лекарственно-чувствительные штаммы МБТ, составила 63,00±5,54 % при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и 61,88±4,13 % - при ТЛ без эозинофилии. В свою очередь, ЛУ-вариант инфекции отмечался у 37,00±4,44 % больных ТЛ с

эозинофилией и $38,12 \pm 3,74$ % пациентов, в крови которых число эозинофилов соответствовало норме. При оценке лекарственной устойчивости возбудителя в целом в группе больных ЛУ ТЛ было установлено, что у $84,61$ % из них регистрировалась устойчивость МБТ к двум препаратам (изониазиду и стрептомицину), в $15,39$ % случаев - к трем препаратам (изониазиду, рифампицину, стрептомицину). У больных ЛУ ТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови прослеживались аналогичные тенденции. В результате проведенного нами корреляционного анализа взаимосвязи эозинофильной реакции крови с устойчивостью МБТ к ПТП выявлено не было.

В ходе настоящего исследования был проанализирован факт возможного влияния эозинофильной реакции крови на сроки негативации мокроты у больных ТЛ. Известно, что конверсия мокроты у больных ТЛ является промежуточным индикатором и клиническим критерием снижения микробной нагрузки, обусловленной эффективностью проводимого лечения. При средней продолжительности пребывания пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, в стационаре $150,5 \pm 31,87$ дней (у больных ТЛ без эозинофилии данный показатель составил $145,16 \pm 40,23$ дней) прекращение бактериовыделения по микроскопии мазка мокроты и результатам посева за весь период лечения в стационаре выявлялось в $81,34 \pm 6,85$ % и $77,24 \pm 4,60$ % случаев соответственно (при $79,27 \pm 4,13$ % и $74,66 \pm 5,30$ % - у больных ТЛ без эозинофилии ($p > 0,05$)). У большей части пациентов ($75,34 \pm 8,27$ %) с ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, негативация мокроты наступала в течение первых двух месяцев лечения ($2,20 \pm 1,50$ мес.). В группе сравнения, где ТЛ сопровождался нормальным содержанием эозинофилов в крови, абациллирование мокроты происходило в течение первых трех месяцев терапии ($3,10 \pm 2,01$ мес.). При проведении сравнительного анализа сроков негативации мокроты при микроскопии мазка мокроты и результатам посева мокроты на питательные среды в зависимости от наличия эозинофилии крови у больных ТЛ не было зарегистрировано достоверных отличий в сроках прекращения бактериовыделения. Отмечалась лишь тенденция к увеличению сроков абациллирования при ТЛ без эозинофилии.

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 в крови составляло $(0,476 \pm 0,099) \times 10^9/\text{л}$ и $5,63 \pm 2,03$ %, что достоверно превышало контрольные значения. Однако высокое содержание эозинофильных гранулоцитов регистрировалось лишь у $37,58 \pm 6,11$ % больных ТЛ с изначально высоким уровнем эозинофилов в крови. 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 $3,10 \pm 1,93$ %). У $66,76 \pm 10,10$ % больных ТЛ без эозинофилии абсолютное и относительное содержание эозинофильных гранулоцитов в крови через 3 месяца после проведения противотуберкулезной терапии оказалось равным $(0,240 \pm 0,061) \times 10^9/\text{л}$ и $3,00 \pm 1,52$ %, что соответствовало контрольным значениям и количеству эозинофилов у пациентов данной группы до лечения. Обращало на себя внимание то, что у $14,57 \pm 3,21$ % больных ТЛ без эозинофилии на момент абациллирования регистрировалось увеличение абсолютного и относительного количества эозинофильных гранулоцитов в крови до $(0,640 \pm 0,110) \times 10^9/\text{л}$ и $8,00 \pm 1,40$ % соответственно, у $18,67 \pm 5,36$ % пациентов, напротив, обнаруживалось снижение числа эозинофильных гранулоцитов до анэозинофилии. При этом среди больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией до лечения, факт анэозинофилии не был зарегистрирован ни у одного пациента.

Продолжительность курса интенсивной терапии у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, составила $3,53 \pm 1,02$ мес., а у пациентов с ТЛ без эозинофилии - $4,0 \pm 1,0$ мес, при этом достоверной разницы между данными параметрами выявлено не было.

Таким образом, ТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови характеризуется отрицательной динамикой рентгенологических признаков повреждения легочной ткани, что свидетельствует о деструктивном потенциале эозинофилов и позволяет расценивать повышение их количества в крови при ТЛ в качестве неблагоприятного фактора течения инфекционного процесса.

Глава 4. Обсуждение результатов исследования

Содержание эозинофильных гранулоцитов в периферической крови при туберкулезной инфекции может быть нормальным, повышенным либо снижаться до анэозинофилии [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]. Эозинофилию крови при туберкулезе легких чаще рассматривают в качестве побочного эффекта проводимой противотуберкулезной терапии, связывая ее возникновение с прямым действием антибактериальных средств и аллергической «настроенностью» организма к препаратам [Мишин В.Ю. и соавт., 2004; Мордык А.В., 2010]. По данным литературы, эозинофилия крови составляет 20 - 25 % от всех аллергических реакций и выявляется в 2 - 5 % случаев на фоне противотуберкулезной химиотерапии [Мордык А.В., 2010]. По мнению других авторов, гемическая эозинофилия регистрируется в 22 % случаев на фоне лечения противотуберкулезными препаратами и составляет 60 % от всех аллергических реакций, к которым относится также кожно-аллергический синдром. При этом у 17 % больных эозинофилия крови сочетается с поражениями печени и почек, а также органическими повреждениями неврологического характера [Мишин В.Ю. и соавт., 2004; Михеева О.М. и соавт., 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 фтизиатрическом 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, пиперазид и этамбутол). При этом эозинофилия являлась единственным проявлением гиперчувствительности к противотуберкулезным препаратам. У отдельных пациентов были зарегистрированы побочные реакции токсико-аллергического характера: диспепсические расстройства – в 5 % случаев, нейропатии – в 2 %, снижение слуха – в 1 %, кожная сыпь – в 6 %.

В большинстве случаев врачи-фтизиатры расценивают такую эозинофилию как лекарственную непереносимость по аллергическому типу и могут отменить

препараты, руководствуясь нормативными документами. Согласно приказу Минздрава России от 21.03.2003 №109 (Приложение №6 Инструкция по химиотерапии больных туберкулезом), развитие аллергических реакций в ходе проведения лечения больных туберкулезом является показанием для исключения препарата основной группы из режима химиотерапии с последующей заменой его на препарат резервного ряда. С другой стороны, замечено, что эозинофильная реакция крови чаще формируется именно при приеме резервных противотуберкулезных препаратов (амикацин, пара-аминосалициловая кислота), применяемых в терапии туберкулеза легких с резистентностью возбудителя к базовым препаратам первого ряда [Мишин В.Ю. и соавт., 2004; Колодийчук Е.В. и соавт., 2007; Михеева О.М. и соавт., 2010]. Эозинофилия крови, возникающая в процессе химиотерапии туберкулезной инфекции, накладывает ограничения на проведение адекватных противотуберкулезных лечебных мероприятий в режиме стандартных схем. Это, в свою очередь, способствует появлению лекарственно-резистентных штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, инициирующих крайне неблагоприятное течение туберкулезного процесса.

Однако существует альтернативная точка зрения о целесообразности возникновения эозинофилии крови на фоне противотуберкулезной терапии. Научные сотрудники отделения гравитационной хирургии крови ОГУЗ НСО «Новосибирская областная туберкулезная больница» констатировали факт гемической эозинофилии на фоне лечения больных ТЛ стандартными противотуберкулезными препаратами в сочетании с иммуномодулирующими агентами (ронколейкином и дендритными клетками) [Никонов С.Д. и соавт., 2002]. Авторы полагают, что эозинофильная реакция крови в данном случае является результатом успешного лечения и патогномичным сигналом состоявшегося иммунного ответа на инфектоген. По мнению исследователей, возрастание числа эозинофильных гранулоцитов крови в начале второго месяца лечения ронколейкином и аутологичными дендритными клетками, сенсibilизированными туберкулином в присутствии ИЛ-2, может свидетельствовать об эффективности лечения и восстановлении антигенспецифического иммунного ответа на инфекцию микобактерией туберкулеза (МБТ) у больных прогрессирующим ТЛ с исходной

туберкулиновой анергией. Исследователи рассматривают такую «лекарственную» эозинофилию в качестве механизма саногенеза, который в понимании большинства врачей ошибочно расценивается как аллергия. В результате этого на фоне успешного лечения туберкулезной инфекции производится отмена препаратов, которые не только эффективно уничтожают МБТ, но и индуцируют активное распознавание антигенов клетками иммунной системы.

Следует подчеркнуть, что наряду с лекарственной эозинофилией в клинической практике врачей-фтизиатров регистрируются случаи эозинофилии крови у больных ТЛ до назначения специфической терапии. В частности, в ранее проведенных исследованиях на кафедре фтизиатрии и пульмонологии и кафедре патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России было показано наличие эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции до лечения [Филинюк О.В., 2001; Земляная Н.А. и соавт. 2007; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2012]. Зарубежные авторы также регистрируют эозинофилию крови у впервые выявленных больных с туберкулезной инфекцией до начала проведения химиотерапии [Legrand F. et al., 2009; Kirman J. et al., 2009; Driss V. et al., 2012]. Зарубежными учеными доказано также присутствие эозинофилов в составе гранулемы, формирующейся в легочной ткани при внедрении *M. tuberculosis* [Lasco T.M. et al., 2004; Kirman J. et al., 2009; Linch N.S. et al., 2009; Nattori Y. et al., 2011]. Специалисты затрудняются однозначно интерпретировать причины и биологический смысл эозинофилии крови и тканей при ТЛ.

Накопленные к настоящему времени в литературе немногочисленные сведения, касающиеся сочетания эозинофилии крови с ТЛ, не позволяют создать целостного представления о патогенезе данной гематологической реакции. Открытым остается вопрос о биологическом значении гемической эозинофилии и роли самого эозинофила в патогенезе туберкулезной инфекции.

Вышеизложенное обуславливает актуальность настоящего исследования, в основу которого положен комплексный подход к изучению механизмов развития эозинофильной реакции крови и ее роли в иммунопатогенезе ТЛ. Исследование проводилось на примере группы больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией

крови. Для установления специфического характера выявленных изменений была сформирована группа сравнения, которую составили больные ТЛ с нормальным содержанием эозинофилов в периферической крови.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, согласуются с данными литературы и указывают на формирование эозинофилии крови у 18 % больных ТЛ до назначения противотуберкулезных препаратов (по результатам анализа медицинских карт пациентов фтизиатрического отделения №1 Томской областной туберкулезной клинической больницы (2009-2012 гг.)). Среди больных ТЛ с эозинофилией, включенных в настоящее исследование, в количестве 102 человек, средние значения абсолютного и относительного содержания эозинофилов в периферической крови составляли $(0,966 \pm 0,110) \times 10^9/\text{л}$ и $(8,790 \pm 0,250)\%$ соответственно. Максимальные значения относительного числа эозинофилов были зарегистрированы при лекарственно-устойчивом варианте диссеминированного ТЛ (ДТЛ) (табл. 8), что не противоречит данным литературы, согласно которым, ДТЛ характеризуется более выраженной степенью нарушений иммунитета с поляризацией его по пути доминирования гуморальных иммунных реакций, ассоциированных с активацией Т-хелперов (Th) типа 2 (Th2). Преобладание Th2-цитокинов, многие из которых обладают эозинофил-активирующими свойствами, по-видимому, может обуславливать формирование эозинофильной реакции крови при данной патологии.

В связи с этим, первый этап настоящего исследования был посвящен изучению молекулярно-генетических механизмов формирования эозинофилии крови при ТЛ, включая оценку полиморфизма генов и анализ секреции ключевых иммунорегуляторных цитокинов, опосредующих иммунный Th2-ответ и одновременно модулирующих функции эозинофильных гранулоцитов.

Основной медиатор гуморального звена иммунного ответа, регулирующий гомеостаз эозинофильных клеток, - IL-5, который стимулирует терминальные стадии эозинофилопоэза в костном мозге, инициирует выход молодых и зрелых клеток в циркуляцию, ингибирует апоптоз эозинофилов и тем самым пролонгирует время их пребывания в кровотоке [Mordvinov V.A. et al., 2001; Nagase H. et al.,

2001; Воробьев А.И., 2002; Barnes P.J., 2003; Takatsu K. et al., 2009; Morshed M. et al., 2012].

При анализе содержания IL-5 в крови его увеличение было установлено у больных ТЛ с эозинофилией; при этом уровень IL-5 в крови у пациентов с туберкулезной инфекцией без эозинофилии не отличался от контрольных значений. Примечательно, что у пациентов с эозинофилией при диссеминированном варианте инфекции регистрировалась более высокая концентрация IL-5 в крови, чем при инфильтративном ТЛ (ИТЛ), что в свою очередь, обуславливало более выраженный характер эозинофильной реакции крови у больных ДТЛ (табл. 9). Среди больных ДТЛ, ассоциированным с эозинофилией, максимальное содержание IL-5 в крови отмечалось при лекарственно-резистентном варианте инфекции (табл. 10). Определяющая роль IL-5 в механизмах формирования гемической эозинофилии у больных ТЛ подтверждалась наличием положительной корреляции между концентрацией IL-5 и абсолютным количеством эозинофильных гранулоцитов в крови при ДТЛ ($r=0,81$, $p<0,05$).

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей, которые регистрировали высокий уровень IL-5 в крови при эозинофилии крови, сопровождающей целый ряд аллергических заболеваний (бронхиальная астма, atopический дерматит и др.) [Broide R. et al., 1992; Tanaka O. et al., 1994; Kay. A.V., 1996]. Кроме этого, в ранее проведенных исследованиях нами была продемонстрирована гиперсекреция IL-5, IL-3 и GM-CSF мононуклеарными лейкоцитами крови при больших эозинофилиях крови, возникающих на фоне онкогематологических заболеваний системы крови и описторхоза [Новицкий В.В. и соавт., 2006, 2007; Рязанцева Н.В. и соавт., 2007]. Анализируя возможные причины увеличения концентрации IL-5 в крови при патологии, многие авторы связывают данные изменения с активацией CD4⁺ клонов Т-лимфоцитов типа Th2 антигенными детерминантами опухолевых клеток, растворимыми метаболитами и структурными компонентами мембраны паразитов и др. [Озерецковская Н.Н., 2000; Волкова М.А., 2001; Nagase H. et al., 2001; Steinke J.W., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2007].

Высокий уровень IL-5 в крови при ТЛ с эозинофилией может поддерживаться за счет секреторной активности многих клеток-продуцентов участников противотуберкулезной резистентности: Th2-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов и НК-клеток. Известно, что IL-5 способны секретировать и сами эозинофильные гранулоциты [Lintomen L. et al., 2007; Johnson V. J. et al., 2008; Mirza S. et al., 2010].

Для уточнения вклада эозинофилов в механизм формирования эозинофилии крови при ТЛ мы оценили способность этих клеток секретировать IL-5. Как показали результаты проведенных нами исследований, спонтанная и BCG-индуцированная секреция IL-5 эозинофильными гранулоцитами *in vitro* оказалась достоверно выше только у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров и у пациентов с туберкулезной инфекцией без эозинофилии (табл. 31). При этом содержание IL-5 в культуре эозинофильных гранулоцитов не зависело от формы заболевания и чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам (ППП). Полученные результаты подтверждают то, что при ТЛ эозинофильные гранулоциты в условиях их избыточного содержания, поддерживаемого высоким уровнем IL-5 в крови, обладают свойством самостоятельно секретировать большие количества данного цитокина. Выступая в качестве аутокринных и паракринных стимуляторов собственной активности и эозинофилопоэза, эозинофилы вносят существенный вклад в пролонгацию своего пребывания в кровотоке. Выявленные изменения индуцированной секреции IL-5 у данной группы больных свидетельствуют также о высоком уровне резервной реактивности эозинофильных клеток, способных реализовывать и далее свой функциональный (гиперэргический) потенциал при дальнейшем увеличении антигенной нагрузки.

Формирование эозинофильной реакции крови при патологии связывают с действием другого эозинофил-активирующего фактора – эотаксина. Последний является представителем CC-семейства хемокинов, впервые обнаруженных в бронхоальвеолярных смывах морских свинок с эозинофильным воспалением легких [Rankin S.M. et al., 2000; Rothenberg M.E. et al., 2007; Tedeschi A. et al., 2012]. Его основная роль заключается в потенцировании процессов

рекрутирования эозинофилов из кровотока в ткани и наоборот [Haley K.J. et al., 2008; Paplinska M. et al., 2007; Manqieri D. et al., 2012]. Наряду с выраженными хемотаксическими свойствами, эотаксин обладает способностью усиливать мобилизацию эозинофилов из костного мозга, обуславливая избыток эозинофильных лейкоцитов в периферической крови [Dent G. et al., 2004; Lintomen L. et al., 2008; Tedeschi A. et al., 2012]. Эотаксин опосредует не только процессы активации и хемотаксиса эозинофильных гранулоцитов, но и их дегрануляцию, индуцирует продукцию активных форм кислорода, то есть обладает выраженной провоспалительной активностью [Lintomen L. et al., 2007; Paplinska M. et al., 2007; Haley K.J. et al., 2008; Lewis T.C. et al., 2012]. На сегодняшний день идентифицировано несколько белков подсемейства эотаксинов: эотаксин-1 (CCL11), эотаксин-2 (CCL24) и эотаксин-3 (CCL26), кодируемых генами разных хромосом. Гены CCL24 и CCL26 локализованы в кластере CС-хемокинов хромосомы 17q11.2, в свою очередь ген CCL11 картирован на хромосоме 7q11.2 [Wise E.L. et al., 2010]. В связи с этим, CCL24 и CCL26 имеют лишь 30 % гомологии последовательности с CCL11, но, несмотря на это, все три хемокина оказывают сходные эффекты, реализуя свое действие через общий специфический рецептор [Zimmermann N. et al., 2000; Zimmermann N. et al., 2003; Wise E.L. et al., 2010].

В ходе настоящего исследования была оценена концентрация CCL11/эотаксина в крови, реализующего весь спектр свойств эотаксинов. Было установлено достоверное повышение уровня CCL11/эотаксина в крови только у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией; у пациентов без эозинофилии уровень данного медиатора в крови соответствовал норме (табл. 9).

Известно, что эозинофильные гранулоциты выступают в качестве активных продуцентов CCL11/эотаксина, избыточная концентрация которого может активировать механизмы, обеспечивающие накопление эозинофилов в крови [Haley K.J. et al., 2008; Paplinska M. et al., 2007; Manqieri D. et al., 2012]. Обращал на себя внимание высокий уровень CCL11/эотаксина в крови у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, выделяющих лекарственно-резистентные штаммы МБТ (табл. 11). Учитывая то, что лекарственно-устойчивый ТЛ (ЛУ ТЛ) характеризуется

более выраженным дисбалансом иммунного Th1-ответа, одним из возможных механизмов избыточного содержания CCL11/эотаксина в крови у больных ТЛ может быть опосредованное влияние иммунорегуляторных цитокинов (IL-4, IL-13 и др.), которые стимулируют экспрессию мРНК эотаксина в эндотелиальных и эпителиальных клетках, а также в фибробластах. Данный факт подтверждается результатами ранее проведенных нами исследований, согласно которым зарегистрирована позитивная корреляционная связь между сывороточным уровнем эотаксина и базальной концентрацией IL-4 в культуре мононуклеарных лейкоцитов крови *in vitro* у больных описторхозом ($r=0,64$, $p<0,05$ – при остром описторхозе с эозинофилией; $r=0,72$, $p<0,05$ – при хроническом описторхозе с эозинофилией) [Новицкий В.В. и соавт., 2006].

Существенное влияние цитокинов Th2-зависимого иммунного ответа в отношении секреции эотаксина продемонстрировано в ряде экспериментальных работ. Так, на модели лабораторных животных показано, что повышенная продукция IL-4 опухолевыми клетками индуцировала накопление эозинофильных гранулоцитов посредством усиления экспрессии мРНК эотаксина-1; введение анти-IL-4-антител таким животным ингибировало экспрессию мРНК эотаксина клетками легочной гранулемы [Atasoy U. et al., 2003; Zafra M. P. et al., 2012]. В исследованиях *in vitro* установлено также, что IL-4 в синергизме с TNF α активировал продукцию эотаксина фибробластами легких [Lewis T.C. et al., 2012]. По данным P.C. Fulkerson et al. [2006], сочетанное действие IL-4, IL-5 и TNF α инициировало многократное повышение концентрации эотаксина в культуре.

Следует отметить, что высокий уровень CCL11/эотаксина в крови при ЛУ-варианте ТЛ мог быть результатом выраженной секреторной активности самих эозинофильных гранулоцитов, в избытке содержащихся в крови у этих пациентов.

В целом, гиперсекреция CCL11/эотаксина, зарегистрированная в крови у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, подтверждает способность CCL11 выполнять скорее функцию эозинофил-аккумулирующего фактора, нежели хемотаксического агента, способного опосредовать миграцию клеток в зону гранулематозного воспаления.

Изучение механизмов эозинофильной реакции крови при патологии включает, с одной стороны, анализ продукции ключевых эозинофил-активирующих медиаторов, а, с другой, - исследование состояния рецепторного аппарата клеток. Известно, что действие любого цитокина реализуется при взаимодействии со специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней. При этом связывание медиатора с комплементарным рецептором сопровождается активацией механизмов сигнальной трансдукции в виде каскада ферментативных реакций, в результате которых в цитоплазме клетки появляются фосфорилированные киназами STAT-белки. Последние транспортируются в ядро, взаимодействуют с энхансерными последовательностями промоторов определенных генов, индуцируют процессы транскрипции, процессинга мРНК и трансляцию различных белковых молекул, и, как следствие, изменение функционального состояния клетки [Patino E. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012]. Отсутствие на мембране рецепторных структур к цитокинам обуславливает невосприимчивость клетки к стимулирующему влиянию соответствующих факторов [Кашкин К.П., 1998]. В то же время рецепторы с высоким аффинитетом не экспрессируются на мембране конститутивно, а появляются на поверхности клетки только в результате ее активации (при связывании с антигенными детерминантами или самими цитокинами) [Фрейдлин И.С., 2001; Симбирцев А.С., 2002, 2004].

Многочисленными исследованиями показано, что эозинофильные лейкоциты экспрессируют на своей мембране различные рецепторные структуры, среди которых особое место занимают рецепторы к цитокинам: IL-5, IL-3, GM-CSF, эотаксинам, TNF α , IL-2, IL-4, IL-9 и др. [Takatsu K. et al., 1994; Bochner B.S., 2000; Mordvinov V.A., 2001; Hauber H.P. et al., 2004; Hogan S.P., 2008; Park Y.M., Bochner B.S., 2010].

При изучении механизмов формирования эозинофилии крови несомненный интерес, на наш взгляд, представляет оценка рецепторов для эозинофил-специфичных цитокинов, дисбаланс экспрессии которых может являться еще одним механизмом, лежащим в основе 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 исследования было зарегистрировано достоверное повышение количества эозинофилов, несущих IL-5RA, в интактной культуре клеток у больных с обеими клиническими формами заболевания с эозинофилией, у больных ТЛ без эозинофилии содержание IL-5RA-положительных клеток соответствовало норме (табл. 12). Установленное нами увеличение фракции эозинофильных клеток, экспрессирующих IL-5RA, при ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, может быть опосредовано влиянием одноименного медиатора, избыточная концентрация которого идентифицирована 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 ($r=0,73$, $p<0,05$).

Полученные нами данные не противоречат результатам других исследователей, согласно которым, описторхозная инвазия и онкогематологические заболевания, ассоциированные с эозинофильной реакцией крови, сопровождались повышением числа IL-5RA⁺ и IL-3R⁺ эозинофильных лейкоцитов в крови [Литвинова Л.С. и соавт., 2007]. Существование взаимосвязи между изученными показателями авторы подтвердили наличием позитивной корреляции между уровнем спонтанной секреции IL-5 мононуклеарными лейкоцитами крови и содержанием IL-5RA-положительных клеток в культуре эозинофилов ($r=0,640$, $p<0,05$ – у больных с острым описторхозом и $r=0,510$, $p<0,05$ – у пациентов с лимфогранулематозом). Другие исследователи продемонстрировали гиперэкспрессию высокоаффинных рецепторов для IL-5 на клетках-предшественницах эозинофилов при гиперэозинофилиях, сопровождающих миелопролиферативные заболевания [Hogan S.P., 2008]. В свою очередь, Y.M. Park, B.S. Vochner [2010], обследуя больных бронхиальной астмой, зарегистрировали избирательную экспрессию CD125 на ранних клетках-предшественницах эозинофилов в костном мозге.

Кроме этого, высокая экспрессия IL-5RA на мембране эозинофильных гранулоцитов при ТЛ может быть опосредована действием других Th2-цитокинов: IL-3, IL-4, GM-CSF и др., поскольку известно, что связывание цитокина со специфическим рецептором приводит к запуску сигнальных каскадов с участием белков, регулирующих транскрипцию генов медиаторных молекул и рецепторных структур [Bochner B.S., 2000]. В исследованиях K.J. Haley et al. [2008] и N.S. Palikhe et al. [2010] показано, что IL-4 индуцирует экспрессию рецепторов на мембране эозинофилов *in vitro* и активирует их.

Наряду с изучением базального уровня экспрессии IL-5RA на мембране эозинофильных гранулоцитов, отражающего фоновую активность клеток, в ходе настоящего исследования оценивалась способность эозинофилов к реактивации рецепторной экспрессии при добавлении *in vitro* рекомбинантного IL-5 (rIL-5). В результате было установлено значительное увеличение содержания IL-5RA-позитивных эозинофилов у больных ТЛ с эозинофилией по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров и пациентов с ТЛ без эозинофилии (табл. 12). 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.

Для эозинофилов человека определен также высокий уровень экспрессии рецепторов к эотаксину - CCR3. Их активация *in vitro* опосредует активацию, хемотаксис и дегрануляцию эозинофильных гранулоцитов [Jose P.J. et al., 1994; Garcia-Zepeda E.A. et al., 1997]. В отличие от других CC-хемокинов, CCL11/эотаксин обладает высокой избирательностью действия в отношении своего рецептора [Fulkerson P.C. et al., 2006; Akuthota P. et al., 2013].

При оценке содержания CCR3-положительных клеток в интактной культуре эозинофильных лейкоцитов *in vitro* нами было зарегистрировано увеличение их количества только у больных ТЛ без эозинофилии по сравнению с таковым в

контрольной группе (табл. 13). В свою очередь, при ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, число эозинофилов, экспрессирующих CCR3, имело лишь тенденцию к повышению, но не достигало статистически значимого уровня. Не было выявлено зависимости числа CCR3⁺ клеток в культуре эозинофилов *in vitro* от чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам (табл. 15). Высокое содержание эозинофильных лейкоцитов, несущих на своей мембране CCR3, в сочетании с нормальным уровнем CCL11 в крови у больных ТЛ без эозинофилии, указывает на ключевую роль комплекса «эотаксин - CCR3» в механизмах рекрутирования эозинофилов в зону гранулематозного воспаления. По-видимому, при ТЛ происходит формирование градиента данного хемокина между кровотоком и очагом инфильтрации с активным вовлечением механизмов адгезии и факторов, регулирующих выживание эозинофильных клеток для осуществления их активного хемотаксиса в легочную ткань. По данным Л.С. Литвиновой и соавт. [2007], данный механизм лежит в основе инфильтрации эозинофилами участков локализации *O. filineus* при хроническом описторхозе. Авторами установлена отрицательная корреляция между значениями стимулированной γ -eotaxin презентации CCR3 и низким уровнем эотаксина в крови ($r=-0,710$, $p<0,05$) у этих больных.

Нормальный уровень CCR3⁺ клеток 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 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 γ IL-5, было установлено достоверное повышение количества CCR3-позитивных эозинофилов относительно их содержания 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.

Таким образом, исследование ключевых эозинофил-активирующих медиаторов, реализующих свое действие через специфические рецепторы, 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 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]. Имеются описания исследований по нахождению связи ТЛ с полиморфизмом генов, кодирующих цитокины иммунного Th2-ответа [Шевченко А.В. и соавт., 2010; Ridruechai C. et al., 2010], которые обладают эозинофил-стимулирующими свойствами.

В связи с этим, в рамках первого этапа исследования была проведена оценка ассоциаций носительства аллельных вариантов полиморфных сайтов генов изученных цитокинов и их рецепторов с количеством эозинофилов в периферической крови, уровнем секреции соответствующих медиаторов и экспрессии рецепторных структур на примере двух общих групп больных ТЛ с эозинофилией и без нее.

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

Известно, что ген *IL5* локализован между генами *IL3*, *IL4*, *IL9*, *IL13* и *GMCSF*, расположенными единым кластером на участке q31 хромосомы 5. В промоторной

области (регулирующей уровень синтеза белкового продукта) гена *IL5* идентифицированы полиморфные сайты, единичные замены нуклеотидов в которых влияют на скорость синтеза транскрибируемого белка [Kabesch M. et al., 2007]. Наиболее хорошо изученным является полиморфизм гена *IL5* в положении 703 промоторной зоны, характеризующийся заменой цитозина на тимин (*C-703T*). По результатам М.Б. Фрейдина и соавт. [2002], функциональный полиморфизм *C-703T* гена *IL5* ассоциирован с бронхиальной астмой и высоким числом эозинофилов в периферической крови. В свою очередь, И.С. Попова и соавт. [2004] установили, что аллель *C* полиморфизма *C-703* гена *IL5* играет первостепенную роль в реализации воспалительного ответа при бронхиальной астме. По данным N. Yamamoto et al. [2003], данный полиморфизм ассоциирован с выраженностью эозинофильной реакции крови при atopическом дерматите. Другие исследователи в качестве фактора риска развития atopического дерматита, напротив, рассматривают носительство аллеля *T* и генотипа *TT* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5* [Карпова А.В., 2009].

В ходе настоящего исследования у больных ТЛ было установлено изменение распределения аллельных вариантов полиморфизма *C-703T* гена *IL5*, что выражалось 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. 16). 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, соответственно, протективный в отношении эозинофилии эффект генотипов *CT* и *TT*, а также аллеля *T* (рис. 2).

Известно, что контроль транскрипции и последующего синтеза медиатора осуществляется за счет транскрипционных факторов, взаимодействующих с сайтами связывания, большинство из которых расположены в промоторах в участке $[-1; -200]$ п.о. по отношению к старту транскрипции. Функциональные сайты могут встречаться и в удаленных 5'-энхансерах, а также в энхансерах, расположенных в интронах (до +1500 п.о. по отношению к старту транскрипции).

Поскольку взаимодействие энхансеров транскрипции происходит по типу «ключ-замок», очевидно, что замена даже одного нуклеотида в области промотора гена приводит к изменению структуры сайтов связывания. Это позволяет факторам транскрипции приобретать большее или меньшее сродство к регуляторным участкам, что в дальнейшем опосредует степень транскрипции и трансляции кодируемого медиатора [Pedroza-Gonzalez A. et al., 2004].

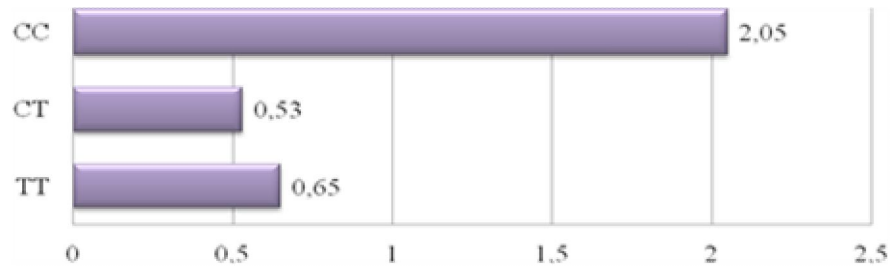


Рис. 2. Показатели относительного риска развития эозинофилии крови при туберкулезе легких в зависимости от генотипа полиморфного сайта C-703T гена *IL5*. Слева генотипы полиморфного сайта C-703T, справа – критерий отношения шансов (OR).

По данным В.А. Мордвинова и Д.П. Фурмана [2009], в регуляции экспрессии гена *IL5* участвуют такие транскрипционные факторы, как AP-1, GATA-3, Oct1/2, YY1 и Ets1, а при определенных условиях клеточной активации еще и NF-AT. В частности, на 5'-конце гена *IL5* идентифицирован сайт связывания специфического октамера и белков семейства NFAT. Запуск транскрипции гена *IL5* опосредован активацией протеинкиназы C и Ca²⁺-кальмодулиновой системы, что в итоге приводит к фосфорилированию NFAT-белков и связыванию их с регуляторной областью гена [Zhu W. et al., 2010; Endo Y. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012].

Анализ зависимости концентрации IL-5 в крови от варианта полиморфного сайта C-703T гена *IL5* показал, что у индивидуумов с генотипом CC (C-703T) гена *IL5* содержание IL-5 в крови значимо 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 IL-5 в крови у больных ТЛ (табл. 20).

Как упоминалось ранее, действие IL-5 реализуется посредством связывания со специфическим рецептором, который состоит из уникальной α цепи (IL-5RA, внеклеточный домен) и общей с IL-3 и GM-CSF β цепи (bc/CD131), которая сама по себе не связывает лиганд, однако повышает сродство цитокина к одноименному рецептору и проводит сигнал внутрь клетки. Повышенный уровень экспрессии рецептора к IL-5 на эозинофильных гранулоцитах у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови, позволяет думать о стимулирующем влиянии промоторной области гена рецептора на уровень экспрессии соответствующего продукта.

В промоторном регионе гена *IL5RA* обнаружено несколько областей с единичными нуклеотидными заменами гуанина на аденин в положениях: -80 (G→A) и -5091 (G→A), влияющими на уровень экспрессии IL5RA [Lida A. et al., 2004; Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J.H. et al., 2007 June-Нуук Lee et al., 2007]. Наиболее изученным является функциональный полиморфизм *G-80A* гена *IL5RA*, значение которого в отношении формирования эозинофильной реакции крови при патологии весьма неоднозначно. По данным одних авторов, полиморфизм *G-80A* гена *IL5RA* ассоциирован с высокой экспрессией рецептора на эозинофилах и развитием эозинофилии при бронхиальной астме и атопическом дерматите [Sehmi R., 1997; Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J.H. et al., 2007]. Другие исследователи указывают на отсутствие достоверной связи полиморфного сайта *G-80A* гена *IL5RA* с развитием бронхиальной астмы, а также с содержанием эозинофилов в периферической крови при данном заболевании [Hoffjan S. et al., 2004].

Проведенное нами иммуногенетическое 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 числа эозинофильных гранулоцитов в крови (табл. 17).

Согласно данным литературы, присутствие аденина в положении 80 промоторного региона гена рецептора к IL-5 обуславливает повышенную активность промотора и, как следствие, гиперэкспрессию IL-5RA на клетках. Однако проведенное нами исследование зависимости количества IL-5RA-

позитивных клеток в культуре эозинофилов *in vitro* от варианта полиморфного сайта *G-80A* соответствующего гена не позволило выявить достоверных различий у больных ТЛ - носителей разных генотипов (табл. 21). По всей видимости, увеличение числа эозинофилов, несущих на своей поверхности IL-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, кодируемый геном, который локализован на 7 хромосоме в участке q11.2. В результате многочисленных исследований установлено, что функционально значимый полиморфизм гена эотаксина-1 зарегистрирован в трех положениях -1328, -426, -384 промоторной области. Показано, что точечная замена аденина на гуанин в положении 384 промотора гена *CCL11* ассоциирована с высокой концентрацией кодируемого хемокина и уровнем общего IgE в крови у больных бронхиальной астмой [Wang T.-N. et al., 2007; 2010]. К.А. Attab et al. [2008] установили возрастание частоты гомозигот по аллелю *G* в позиции -384 при бронхиальной астме в Иорданской популяции. D. Wagsater et al. [2007] показали ассоциацию аллеля *G* полиморфного сайта *A-384G* с развитием колоректального рака и низким сывороточным уровнем CCL11.

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. 18). Выявлены статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного сайта *A-384G* гена *CCL11* у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией и у здоровых доноров. Вместе с тем, найдена 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; для аллеля *A* и генотипа *AA* был показан протективный эффект в отношении эозинофильной реакции крови (рис. 3).

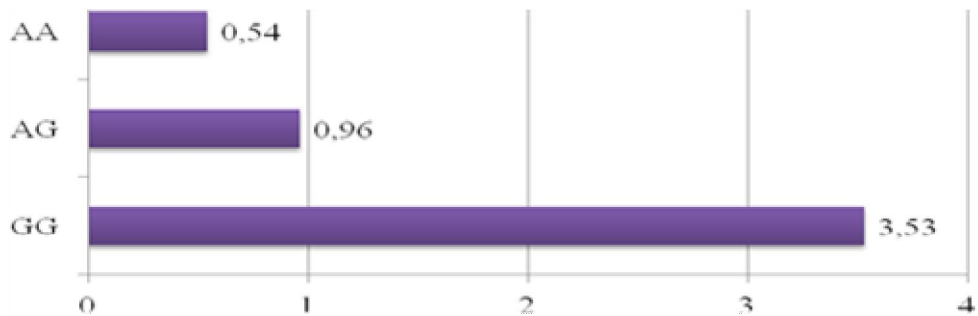


Рис. 3. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа локуса *A-384 G* гена *CCL11*. Слева генотипы полиморфного сайта *A-384 G*, справа – критерий отношения шансов (OR.)

Известно, что продукция CCL11/эотаксина является индуцибельной: активация транскрипции гена зависит от связывания энхансеров транскрипции NF-κB, AP-1 и STAT6 с определенными участками регуляторной области гена [Zafra M.P. et al., 2012]. 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. 22). 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. В промоторной области гена *CCR3* идентифицированы 10 полиморфных сайтов в различных положениях. Установлено, что полиморфизм *G-22557A* и *C-174T* гена *CCR3* ассоциирован с эозинофильной реакцией крови при бронхиальной астме. В отношении полиморфизма *-520 T>G*, *-174C>T* и *+51 T>C* также установлена связь с развитием бронхиальной астмы в британской и японской популяциях [Fukunaga K. et al., 2001]. В свою очередь, J.-H. Lee et al. [2007] показали, что у больных бронхиальной астмой сочетание аллелей *A* (*22557 G>A*), *G*

(-520 $T>G$), T (-174 $C>T$) и (+51 $T>C$) ассоциировано с эозинофилией крови. По данным M.J. Vugeja et al. [2006] и S.A. Al-Abdulhadi et al. [2010], полиморфизм $T-51C$ гена $CCR3$ ассоциирован не только с бронхиальной астмой и атопическим дерматитом, но и с множественным склерозом и гепатитом С.

В результате проведенного нами иммуногенетического исследования полиморфного сайта $T-51C$ гена $CCR3$ было установлено, что у пациентов с ТЛ, независимо от количества эозинофилов в периферической крови, наиболее часто встречающимся генотипом является гомозиготный по аллелю T , а наиболее редким – гомозиготный вариант CC . Однако среди больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, носители гомозиготного варианта TT встречались реже, чем среди больных ТЛ без эозинофилии, а носители гомозиготного генотипа CC , напротив, чаще (табл. 19). В ходе статистического анализа установлены значимые различия в распределении аллельных вариантов полиморфного сайта $T-51C$ гена $CCR3$ у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией и здоровых доноров. Кроме этого, обнаружены достоверные различия в распределении аллелей и генотипов полиморфизма $T-51C$ гена $CCR3$ у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и без таковой.

Зарегистрирована положительная ассоциация аллеля C и генотипа CC ($T-51C$) гена $CCR3$ с развитием эозинофильной реакции крови при ТЛ (и соответственно протективный эффект генотипов CT , TT и аллеля T полиморфизма $T-51C$ гена $CCR3$).

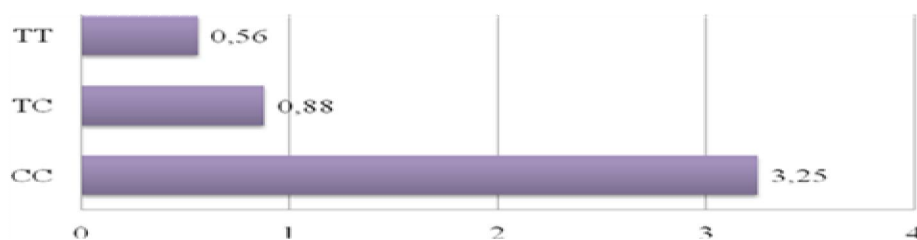


Рис. 4. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа полиморфного сайта $T-51C$ гена $CCR3$. Слева генотипы полиморфного сайта $T-51C$, справа – критерий отношения шансов (OR)

Ген *CCR3* картирован на хромосоме 3p21 и включает 4 экзона. Регуляция транскрипции гена *CCR3* осуществляется в промоторной области, где локализованы сайты связывания таких транскрипционных факторов как GATA-1, PU-1 и C/EBP [Zimmermann N. et al., 2005]. При исследовании зависимости содержания *CCR3*-позитивных клеток в культуре эозинофилов крови от варианта полиморфного сайта *T-51C* соответствующего гена нами не было выявлено 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.

Следует отметить, что наличие определенных аллелей генов цитокинов и их рецепторов по отдельности производит слабый эффект, тогда как их сочетание детерминирует формирование специфичности ответа макроорганизма на антиген, способствуя или препятствуя развитию определенной болезни [Симбирцев А.С., Громова А.Ю., 2005]. Это обусловлено полиморфностью цитокин-рецепторной сети, особенностями плейотропного (взаимозаменяемого) действия многих цитокинов [Абрамов Д.Д. и соавт., 2011]. В связи с этим, приоритетным на сегодняшний день является анализ ассоциированности заболеваний с целым набором аллелей генов цитокинов и рецепторных структур.

Учитывая вышеизложенное, в ходе настоящего исследования был проведен анализ ассоциаций аллельных вариантов полиморфных сайтов *C-703T* гена *IL5* и *G-80A* гена *IL5RA*, а также полиморфизма *A-384G* гена *CCL11* и *T-51C* гена *CCR3* с риском развития эозинофильной реакции крови при ТЛ.

В результате исследования наибольший риск развития эозинофилии при ТЛ выявлялся при сочетанном носительстве гомозиготных генотипов *CC* (*C-703T*) гена *IL5* и *AA* (*G-80A*) гена *IL5RA* (OR=8,95) (рис. 5). Напомним, что генотип *CC* (*C-703T*) гена *IL5* ассоциирован с высоким уровнем секреции IL-5.

Иммуногенетический анализ комбинаций генов показал также сочетания генотипов с протективным (*CT IL5/GA IL5RA*, *CT IL5/GG IL5RA*, *CT IL5/GA IL5RA*, *TT IL5/GA IL5RA*) и предрасполагающим (*CC IL5/AA IL5RA*, *CC IL5/GA IL5RA*, *CC IL5/GG IL5RA*) к развитию гемической эозинофилии эффектами (рис. 5).

Относительный риск развития (OR) эозинофильной реакции крови среди носителей предрасполагающих комбинаций генов варьировал в диапазоне от 3 до 9 раз.

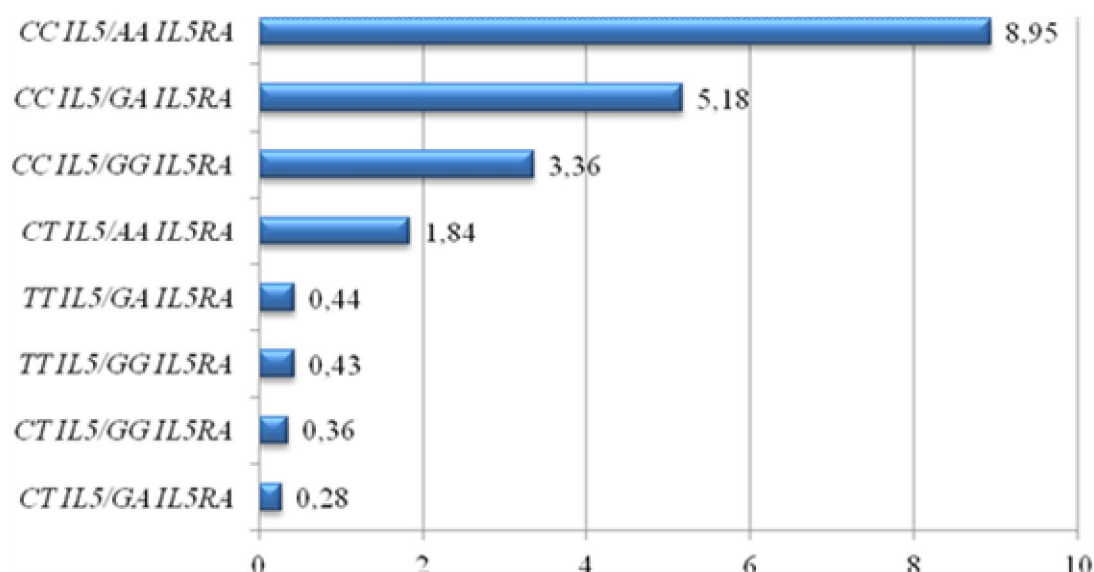


Рис. 5. Риск развития эозинофилии крови при туберкулезе легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов C-703T гена *IL5* и G-80A гена *IL5RA*. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов и рецепторов, справа – критерий отношения шансов (OR).

При исследовании сочетаний генотипов полиморфного сайта A-384G гена *CCL11* и T-51C гена *CCR3* с риском развития эозинофилии крови при ТЛ нами были идентифицированы три комбинации генов, оказывающие протективный эффект: AA *CCL11*/TT *CCR3*, AA *CCL11*/TC *CCR3*, AG *CCL11*/TC *CCR3*, и четыре комбинации с предрасполагающим действием, т.е. повышающие риск развития эозинофилии при ТЛ: AG *CCL11*/TT *CCR3*, AA *CCL11*/CC *CCR3*, AG *CCL11*/CC *CCR3*, GG *CCL11*/CC *CCR3* (рис. 6).

Наличие ассоциации полиморфизма C-703T гена *IL5* и A-384G гена *CCL11* с уровнем секреции IL-5 и CCL11/эотаксина обосновывает необходимость исследования комбинаций генотипов полиморфных участков генов вышеупомянутых цитокинов с риском развития эозинофильной реакции крови при ТЛ. В результате статистического анализа было установлено, что наибольший риск развития эозинофилии крови при ТЛ ассоциирован с одновременным носительством генотипа CC (C-703T) гена *IL5* и генотипа GG (A-384G) гена *CCL11*

(OR=2,87).

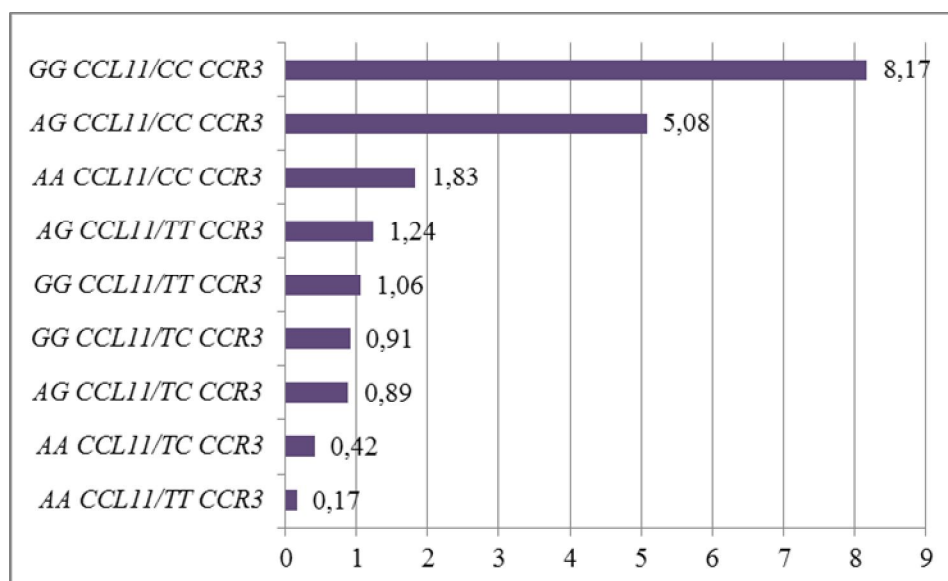


Рис. 6. Риск развития эозинофилии крови при туберкулезе легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов A-384G гена эотаксина и T-51C гена CCR3. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов, справа – критерий отношения шансов (OR).

Проведенное нами иммуногенетическое исследование сочетаний генотипов позволило констатировать также комбинации с протективным эффектом (*TT IL5/GG CCL11*, *CT IL5/AA CCL11*, *TT IL5/AA CCL11*) (рис. 7). Следует подчеркнуть, что выявленная по итогам настоящего исследования протекция в отношении развития эозинофильной реакции крови при ТЛ явилась результатом сочетания генотипа *TT* полиморфизма *C-703T* гена *IL5* и генотипа *GG* полиморфного участка *A-384G* гена *CCL11* (OR=0,27). У носителей данных ассоциаций генотипов был зарегистрирован низкий уровень секреции IL-5 и высокий уровень CCL11/эотаксина в крови.

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*.

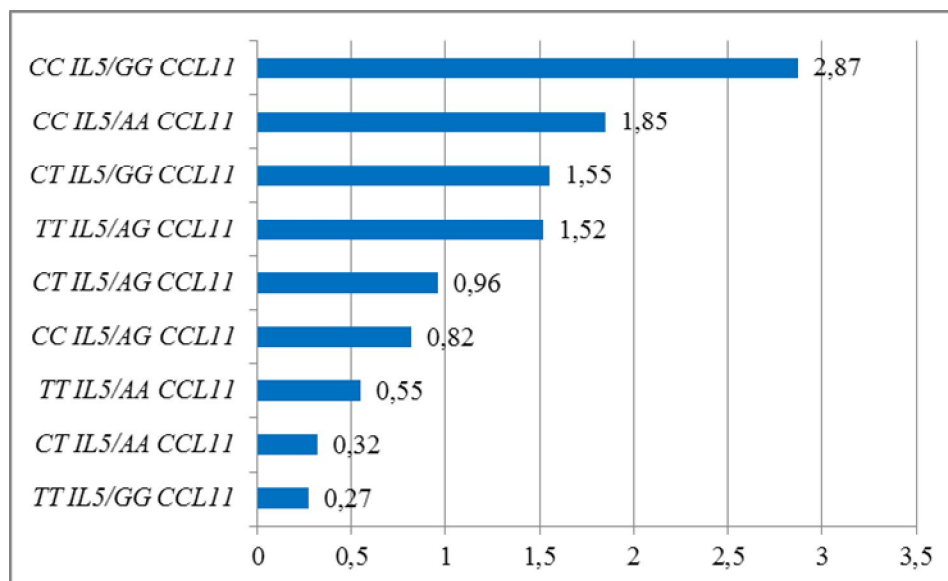


Рис. 7. Риск развития эозинофилии крови при туберкулезе легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов С-703Т гена IL5 и А-384G гена CCL11. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов, справа – критерий отношения шансов (OR)

Дисбаланс секреции ключевых эозинофил-активирующих факторов и экспрессии комплементарных им рецепторов создает необходимые условия для чрезмерной активации эозинофилов крови, готовых к дальнейшей миграции в очаг гранулематозного воспаления, а также обратной рециркуляции в кровоток.

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; Hattori Y. et al., 2011]. Эозинофильные гранулоциты (в большом количестве) обнаруживаются в ткани легкого и бронхоальвеолярных смывах, а также в периферической крови у лабораторных животных и пациентов с ТЛ [Castro A.G. et al., 1991]. Авторы высказывают предположения о способности самих бактерий выступать в роли эозинофил-аккумулирующих агентов за счет определенных компонентов клеточной стенки либо высвобождения факторов, оказывающих

стимулирующий эффект в отношении эозинофилов [Linch N.S. et al., 2009; Hattori Y. et al., 2011]. В то же время, некоторые ученые не подтверждают факт эозинофильной инфильтрации туберкулезной гранулемы и ставят под сомнение участие эозинофилов (клеток поздней фазы аллергических реакций) в патогенезе инфекции, ассоциированной с преимущественной активацией клеточно-опосредованного иммунного ответа [Мишин В.Ю., 2001].

Значительный интерес к исследованию эозинофилов в контексте бактериальной инфекции обусловлен переосмыслением сложившихся представлений о функциональных возможностях этих клеток в норме и при патологии. На сегодняшний день, эозинофилы рассматриваются в качестве полифункциональных клеток, обладающих цитотоксическими, фагоцитарными и иммунорегуляторными функциями [Henderson J.P. et al., 2001; Lacy P. et al., 2003; Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Speirs R.S. et al., 2009; Park Y.M., Vochnner B.S., 2010]. Идентифицированы новые, ранее неизвестные гранулярные протеины эозинофилов, цитокины и ростовые факторы, мембранные рецепторы, что указывает на полноценное вовлечение эозинофильных гранулоцитов в патогенез инфекционного процесса. Однако изучение эозинофила в новом качестве находится лишь на начальном этапе, в связи с чем однозначная интерпретация роли этих уникальных клеток (в условиях их избыточного содержания в крови и тканях) в патогенезе инфекционных заболеваний в настоящее время представляется во многом открытой. До настоящего времени дискутируется вопрос о том способствуют эозинофильные гранулоциты иммунной защите макроорганизма от МБТ или, напротив, служат дополнительным резервуаром персистенции инфекта и участником деструктивных изменений в ткани легких?

В связи с вышеизложенным, второй этап настоящего исследования был посвящен изучению особенностей функциональной активности эозинофильных гранулоцитов при ТЛ с эозинофилией и без нее.

Общеизвестно, что эозинофилы - агрессивные эффекторные клетки и источник цитотоксических факторов, принимающих активное участие в реализации воспалительных реакций макроорганизма. Вместе с тем, гранулы

эозинофилов богаты биологически активными веществами, которые оказывают обратное (противовоспалительное) действие. Являясь участником механизмов «первой линии защиты», эозинофилы, с одной стороны, способны отграничивать область локальной защитной реакции, протекающей на уровне слизистых оболочек, а с другой - вызывать деструктивные изменения в тканях.

Реализация про- и противовоспалительных функций эозинофильных гранулоцитов осуществляется главным образом в очаге воспаления, куда клетки мигрируют при участии хемокинов и молекул адгезии. Посредством адгезивных молекул (селективных рецепторов) происходит начальное прикрепление и «роллинг» гемических эозинофилов *in vivo* [Wardlaw A.J., 1999]. Прочная адгезия и миграция эозинофилов через сосудистый эндотелий обеспечивается 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]. Дальнейшая миграция эозинофилов в легочную ткань может осуществляться посредством VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -интегрин)/VCAM-1-зависимого процесса [Gonzalo J.A. et al., 1996]. Известно, что молекулы адгезии LFA-1 представлены на неактивированных эозинофилах, в случае активации на мембране клеток экспрессируются Mac-1, VLA-4, $\alpha_4\beta_7$ и др., увеличивается плотность LFA-1. При воспалении происходит значительное усиление экспрессии α - и β -цепей интегрина Mac-1, CD66b и CD9 (семейство тетраспанинов) на мембране эозинофилов, тогда как экспрессия других молекул адгезии (CD69, CD29, CD49b и CD44) существенно не изменяется [Kunkel E.J., Butcher E.C., 2002].

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 эозинофилов, несущих молекулу адгезии CD9, у всех больных соответствовало

контрольным значениям. При этом у пациентов с ТЛ в сочетании с эозинофилией крови количество CD18-презентирующих эозинофилов достоверно превышало их число у больных без эозинофилии (табл. 24). Это может быть связано со способностью IL-5 усиливать экспрессию на мембране эозинофилов 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 ($r=0,79$, $p<0,05$).

По мнению некоторых авторов, IL-5, секретируемый эозинофилами аутокринно приводит к усилению экспрессии интегриновых молекул CD11b/CD18 (интегрин Mac-1) на мембране эозинофилов, что является одним из механизмов, инициирующих хемотаксис последних в участок воспалительной реакции [Беклемишев И.Д., 1998; Зайцева О.В. и соавт., 2000; Curran C.S., Bertics P.J., 2012]. В свою очередь, N. Terada et al. [1995] установили, что IL-5 способен активировать экспрессию гена *ICAM1* клетками эпителия бронхов, в результате чего кодируемый геном цитокин ICAM-1 выступает в качестве индуктора экспрессии молекул адгезии на клетках.

Дальнейшее привлечение эозинофилов в очаг гранулематозного воспаления осуществляется при участии хемокинов и экспрессии соответствующих рецепторов. Как уже 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]. Роль IL-5 в индукции эозинофил-опосредованного воспаления представляется неоднозначной. При введении аллергена IL5-трансгенным мышам с высоким содержанием IL-5 в крови регистрировалась эозинофильная инфильтрация легких; введение животным анти-IL-5-антител нивелировало гиперэозинофилию, однако не влияло на степень эозинофильной инфильтрации [Kougo T. et al., 2009]. Кроме этого, установлено, что антиген-индуцированная тканевая эозинофилия может развиваться у IL-5-дефицитных

мышей [Foster P. et al., 1996; Hogan S.P. et al., 1997]. Все это указывает на способность IL-5 кооперироваться с эотаксинами в индукции эозинофилии тканей.

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 количества CCR3-позитивных клеток в культуре эозинофилов при добавлении рекомбинантного IL-5 (относительно их количества в интактной культуре). Наряду с этим, у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией отмечалось увеличение 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 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 [Hosoki K. et al., 2012]. К факторам хемотаксиса эозинофильных гранулоцитов относятся также некоторые цитокины. IL-1 стимулирует привлечение дополнительных «порций» эозинофилов посредством усиления наработки PAF, IL-8 и GRO α , опосредующих хемотаксис клеток [Sanz M.J., 1995; Curran C.S., Bertics P.J., 2012]. Показано участие TNF α в процессах миграции эозинофильных гранулоцитов в очаг воспаления при аллергическом поражении воздухоносных путей и гельминтозах. Действие цитокина реализуется посредством индукции цитокинсекреторной активности эпителиальных клеток, образующих RANTES (хемоаттрактант эозинофилов) [Беклемишев И.Д., 1998]. Кроме этого, TNF α в кооперации с IL-1 усиливают экспрессию VCAM-1 на сосудистой эндотелии и опосредуют VLA-4-зависимую адгезию эозинофильных гранулоцитов [Davies R.G. et al., 1995]. TNF α совместно с IL-4 и IL-13 обеспечивает также формирование клеточных (эозинофильных)

инфильтратов в эпителии бронхов, осуществляя регуляцию экспрессии ICAM-1 [Зайцева О.В. и соавт., 2000; Fulkerson P.C., 2006].

В целом, 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 гранулярных протеинов, а также метаболитов кислорода и азота, выделяемых при дегрануляции клеток [Domachowske J.V. et al., 1998; Hamann K.J. et al., 1999; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008]. Синергистическое действие данных механизмов обеспечивает максимальный киллинговый эффект. В экспериментах *in vitro* зарегистрирован факт спонтанной цитотоксичности эозинофильных гранулоцитов [Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Важнейшими в функциональном отношении являются внутриклеточные катионные белки, многие из которых обладают антибактериальными свойствами. Ключевой гранулярный протеин эозинофилов - главный щелочной белок (МВР), цитотоксический эффект которого реализуется за счет изменения поверхностного заряда клетки, что приводит к возмущению липидного бислоя мембраны и повышению ее проницаемости [Hamann K.J. et al., 1991; Hogan S.P., Rosenberg H.F., 2008]. МВР считается основным эффектором противопаразитарного и противоопухолевого ответа, сопровождающегося эозинофилией. Установлен токсический эффект данного белка в отношении *Salmonella typhimurium* и *Shigella* [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006].

Свои свойства МВР осуществляет в комплексе с эозинофильным катионным протеином (ЕСР) и эозинофильной пероксидазой (ЕРО). Показано, что эозинофильный катионный протеин проявляет более выраженную (в 8-10 раз большую, чем у МВР) токсичность в отношении инфектогенов паразитарной природы, участвует в противовирусном иммунитете (за счет рибонуклеазной активности), а также обладает бактерицидными свойствами [Джальчинова В.Б.,

Чистяков Г.М., 1999]. Механизм бактерицидного действия ЕСР связан с образованием пор в клеточной стенке и не зависит от свойств рибонуклеазы [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006].

В свою очередь, ЕРО 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. Анион гипотиоциановой кислоты, образующийся в ходе реакции, блокирует гликолиз и НАДФ-зависимые реакции бактерий [Воробьев А.И., 2003; Wang J., Slungaard A., 2006; Hogan S.P. et al., 2008]. F. Legrand et al. [2009] продемонстрировали взаимодействие эозинофильных гранулоцитов с *M. tuberculosis in vitro*, в результате чего было зарегистрировано высвобождение α -дефензинов и ЕРО, инициирующих повреждение клеточной стенки и последующий лизис бактерий. Эозинофильная пероксидаза способна также потенцировать цитотоксичность гранулярных протеинов, которые, в свою очередь, повышают клеточную проницаемость, усиливают хемотаксис лейкоцитов в очаг воспаления, опосредуют фагоцитарную активность клеток [Henderson J.P. et al., 2001; Lacy P. et al., 2003]. Следует отметить, что в состав первичных гранул эозинофилов входит миелопероксидаза - фермент, катализирующий образование хлорноватистой кислоты и других токсичных агентов, угнетающих жизнедеятельность многих бактерий. В отличие от миелопероксидазы нейтрофилов ЕРО обладает способностью инициировать повреждение патогена и в отсутствие перекиси водорода [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 эозинофильной реакции крови, регистрировалось снижение пероксидазной активности эозинофилов по сравнению с нормой (табл. 27).

Данные изменения, на наш взгляд, могут являться следствием усиления дегрануляционной активности клеток, обладающих повышенной чувствительностью ко многим сигналам. Вместе с тем, пролонгированная

антигенная стимуляция может приводить к повышению в циркуляции числа рекрутированных из тканей эозинофилов с большой продолжительностью жизни, что, по данным М.А. Giembycz, М.А. Lindsay [1999], коррелирует со способностью клеток подвергаться «тотальной дегрануляции». По данным А.И. Маянского [2004], снижение уровня миелопероксидазы и катионных белков в нейтрофилах связано с высвобождением их в очаге инфекции, что определяет выраженность экссудативного воспаления при ТЛ.

Снижение активности пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах при ТЛ может быть также 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 эозинофильных гранулоцитов может быть отражением угнетения их цитотоксической функции, реализуемой в отношении *M. tuberculosis*.

Следует отметить менее выраженный характер снижения активности пероксидазы в эозинофилах при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с таковой у больных туберкулезом без эозинофилии (табл. 27, 28). По-видимому, в условиях длительного активирующего влияния IL-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*. Несмотря на то, что количество фермента в зрелых гранулоцитах является величиной постоянной (формирование гранулярных протеинов осуществляется на стадии костномозгового гранулоцитопоэза), установлено, что при длительной стимуляции клеток возможен синтез активных форм энзимов [Буряя Т.Л., 1991; Тотолян А.А., Фрейдлин И.С., 1999; Филинюк О.В., 2011]. Возможность наработки гранулярных протеинов в гемических и тканевых эозинофилах подтверждается также результатами исследования R. Braun et al. [1993], которые продемонстрировали способность эозинофильных гранулоцитов синтезировать и секретировать специфичные цитотоксические белки в условиях высокого содержания IL-5, IL-3 и RANTES в крови [Воробьев А.И., 2002].

В целом, в литературе представлены данные об увеличении содержания лизосомальных катионных белков и пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах при различных заболеваниях, сопровождающихся эозинофильной реакцией крови [Merz et al., 1991; Комарова Л.С. и соавт., 2004; Литвинова Л.С. и соавт., 2006]. Так, Л.С. Литвинова и соавт. [2006] зарегистрировали повышение среднего цитохимического коэффициента катионных белков и ЕРО в эозинофилах крови у пациентов с онкогематологическими заболеваниями и описторхозом, ассоциированными с эозинофилией. Установленные изменения носили типовой характер и не зависели от этиологического варианта эозинофильной реакции. Другими авторами показано высокое содержание внутриклеточных лизосомальных белков в эозинофилах и ЕСР в сыворотке крови при идиопатическом гиперэозинофильном синдроме и миелоидном лейкозе [Комарова Л.С. и соавт., 2004]. Н. Merz et al. [1991] также констатировали увеличение сывороточных уровней ЕСР и МВР у больных с негематологическими опухолями, сопровождающимися эозинофилией. По мнению большинства исследователей, высокая концентрация цитотоксических белков в гранулах эозинофилов является отражением усиления их функциональной активности при патологии [Furuta G.T. et al., 2005; Plager D.A. et al., 2006; Hogan S.P., Rosenberg H.F., 2008; Eltboli O., Brightling C.E., 2013].

Как упоминалось ранее, важную роль в осуществлении эффекторного потенциала эозинофильных лейкоцитов отводят кислородзависимым механизмам бактерицидности. В составе плазматической мембраны эозинофилов присутствует ферментный комплекс - NADPH-оксидаза, при участии которого происходит образование активных форм кислорода - веществ крайне токсичных для многих микроорганизмов [Lacy P. et al., 2003]. Согласно данным литературы, NADPH-оксидаза эозинофильных гранулоцитов отличается особенностями локализации по сравнению с другими лейкоцитами [De Coursey T.E. et al., 2001; Cherny V.V. et al., 2001; Lacy P. et al., 2003]. По сведениям J.L. Bankers-Fulbright et al. [2003], в эозинофилах отмечается высокая экспрессия NADPH-оксидазы (в составе плазматической мембраны) в сравнении с нейтрофилами, у которых фермент имеет преимущественно внутриклеточную локализацию. Это объясняется спецификой

эффекторных функций гранулоцитов, способных уничтожить патоген путем секреции токсических метаболитов кислорода в межклеточное пространство, а также в процессе фагоцитоза [Cherny V.V. et al., 2001].

Эозинофилы являются микрофагами, которые мигрируют из циркуляции в очаг воспаления, где поглощают гранулы тучных клеток, иммунные комплексы, бактерии и др. [Park Y.M., Vochner B.S., 2010]. После поглощения объекта происходит активации гексозомонофосфатного шунта, генерирующего восстановленный NADP, с последующим образованием высокотоксичных супероксидных и нитроксидных радикалов, которые инициируют процессы перекисного окисления мембранных липидов клеточной стенки микроорганизмов [Lacy P. et al., 2003]. Являясь непрофессиональными фагоцитами, эозинофилы, тем не менее, одними из первых (наряду с макрофагами и нейтрофилами) взаимодействуют с инфекционным агентом и составляют основу эффекторной фазы защитных реакций макроорганизма. Экстренная мобилизация гранулоцитов сопровождается активацией внутриклеточных метаболических процессов, опосредующих респираторный взрыв в клетках, а также высвобождение в окружающее пространство бактерицидных субстанций [Воробьев А.И., 2002, 2003].

Известно, что процесс фагоцитоза является ключевым инструментом защиты макроорганизма от МБТ. В литературе представлены различные сведения о фагоцитарной активности лейкоцитов крови при ТЛ. Так, А.И. Задорожный и соавт. [1992] зарегистрировали снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови. Другие исследователи констатировали преимущественное усиление бактерицидной активности нейтрофильных гранулоцитов [Макинский А.И. и соавт., 2004; Комогорова Е.Э. и соавт., 2005]. Имеются сообщения о проявлении супрессорных свойств клетками моноцитарно-макрофагального ряда при ТЛ, что обуславливает нарушение антигенспецифического иммунного ответа. Вместе с тем, Г.О. Каминская и соавт. [2002] установили у больных ТЛ повышение активности нейтрофильных гранулоцитов в отношении формирования «респираторного взрыва» при взаимодействии с патогеном; при ухудшении течения специфического процесса

авторы отмечали угнетение базального кислород-зависимого метаболизма клеток. По мнению исследователей, тяжелый остро прогрессирующий ТЛ характеризуется перенапряжением бактерицидных систем клеток, что обуславливает истощение их резервных возможностей и снижение ответа на митогенную стимуляцию. Данный тезис сопоставим с результатами, полученными О.В. Филинюк [2011], согласно которым, мультилекарственно-устойчивый (МЛУ) и лекарственно-чувствительный ТЛ сопровождаются снижением содержания активных нейтрофилов, их НСТ-реактивности и доли завершеного фагоцитоза.

В литературе достаточно полно охарактеризованы изменения фагоцитарных свойств нейтрофилов и моноцитов при ТЛ [Земляная Н.А. и соавт., 2006; Филинюк О.В. и соавт., 2006; 2011], тогда как сведения, касающиеся участия эозинофильных гранулоцитов в механизмах борьбы с МБТ единичны. 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 содержания фагоцитирующих эозинофилов. Примечательно, что у больных ТЛ с эозинофилией содержание фагоцитирующих клеток достоверно превышало их число у больных, в крови которых количество эозинофилов соответствовало норме (табл. 29). Выявленные изменения могут быть следствием активирующего влияния IL-5 и CCL11/эотаксина, способных усиливать экспрессию на мембране клеток молекул адгезии, опосредовать 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.

Л.С. Литвинова и соавт. [2006] в своих исследованиях показали также увеличение количества эозинофилов с высоким биоцидным потенциалом (по отложению гранул диформаза в НСТ-тесте) при больших эозинофилиях крови, сопровождающих лимфогранулематоз, миеломную болезнь и описторхоз. По мнению авторов, усиление фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов крови при заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы может опосредовать эффективную элиминацию патогена из организма. Увеличение числа фагоцитирующих эозинофилов при ТЛ, по-видимому, обуславливает способность клеток (наряду с моноцитами и нейтрофилами) вносить определенный вклад в главный механизм уничтожения инфектогена при ТЛ. Однако, учитывая способность особо вирулентных *M. tuberculosis* снижать бактерицидный потенциал эффекторных клеток, и низкую активность пероксидазы эозинофилов, зарегистрированную в настоящем исследовании, высока вероятность формирования незавершенного фагоцитоза, в результате чего эозинофилы могут являться дополнительным резервуаром персистенции микобактерий, способствуя диссеминации инфекции.

Как упоминалось ранее, 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; Reece P. et al., 2013]. В экспериментах продемонстрирована антигенраспознающая функция изучаемых клеток. 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; Reece P. et al., 2013]. По данным некоторых авторов, эозинофилы способны также осуществлять процессинг и презентацию антигенов различной природы клеткам иммунной системы и тем самым проявлять антигенпрезентирующую функцию [Shi H., 2005]. Учеными был зарегистрирован умеренный уровень экспрессии HLA I и II класса, а

также CD86 (B7.2) и CD30L (CD153) на мембране эозинофилов. В исследованиях S.D. Mawhorter et al. [1994] эозинофилы (при добавлении в культуру GM-CSF) усиливали эффективный пролиферативный потенциал Т-лимфоцитов на стафилококковый суперантиген (стафилококковые энтеротоксины А, В и Е). В других исследованиях инкубация культуры эозинофильных гранулоцитов и CD4⁺ Т-лимфоцитов с риновирусом-16 человека сопровождалась усилением Т-клеточной пролиферации и секреции ими IFN γ [Handzel Z.T. et al., 1998].

Наряду с участием в распознавании и презентации антигена Т-лимфоцитам, эозинофилы являются источником широкого спектра цитокинов [Lacy P., Moqbel R., 2000; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Moqbel R., Coughlin J.J., 2006; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; Speirs R.S. et al., 2009; Park Y.M., Bochner B.S., 2010; Xue F.M. et al., 2012]. Особенностью цитокинсекреторной активности эозинофильных гранулоцитов является способность клеток депонировать некоторые факторы в виде преформированных медиаторов в своих гранулах (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-17A, TNF α , GM-CSF, эотаксины, RANTES и TGF α) [Lacy P., Moqbel R., 1997; Kay A.B. et al., 2004; Melo R.C. et al., 2005, 2008; Spencer L.A. et al., 2009; Al-Muhsen S. et al., 2013; Esnault S. et al., 2013; Dias P.M., Banerjee G., 2013]. Такой механизм определяет возможность немедленного высвобождения медиатора при получении активационного сигнала. Выраженный цитокинсекреторный потенциал эозинофилов обуславливает формирование взаимонаправленных эффектов, опосредованных как иммуномодулирующим действием иммунокомпетентных клеток, так и способностью лейкоцитов эозинофильного ряда активировать (или дезактивировать) лимфоциты, вызывая поляризацию иммунного ответа, направляя его по одному из вариантов развития.

Установлено, что 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 [Moqbel R., Coughlin J.J., 2006; Blanchard C., Rothenberg M.E., 2009; 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 ходе настоящего исследования 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* [Сахно Л.В. и соавт., 2011; Симбирцев А.С., 2011]. Основными продуцентами IL-2 являются активированные Th1-лимфоциты, однако эозинофильные гранулоциты обладают способностью не только самостоятельно секретировать данный цитокин, но и экспрессировать комплементарный ему рецептор. Связывание костимулирующих молекул CD28 на мембране эозинофильных гранулоцитов приводит к секреции IL-2 и IFN γ – медиаторов, опосредующих протективный клеточно-зависимый иммунный ответ [Woerly G. Et al., 1999; Lacy P., Moqbel R., 2000]. По данным G. Woerly et al. [1999].

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. 32).

Однозначная интерпретация изменений IL-2-секреторной функции эозинофилов при ТЛ представляется затруднительной. Сведения литературы, касающиеся синтеза IL-2 клетками крови при инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, также весьма неоднозначны. Большинство авторов в своих исследовательских работах указывают на дефицит продукции IL-2 при деструктивных формах ТЛ, связывая степень угнетения секреции этого цитокина с тяжестью инфекционного процесса [Симбирцев А.С., 1998; Гергерт В.Я. и соавт., 1999]. В исследованиях, проведенных О.В. Воронковой и соавт. [2007], также было зарегистрировано снижение секреции IL-2

мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* в острый период ТЛ, что, по мнению авторов, являлось результатом токсического действия *M. tuberculosis*. Вероятно, этот механизм можно применить и по отношению к интерпретации изменений IL-2-секреторной функции эозинофилов, способных активно взаимодействовать с *M. tuberculosis* и поглощать их. 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]. Согласно современным данным, роль TNF α при ТЛ определяется его концентрацией: дефицит продукции цитокина опосредует тяжелое течение инфекционного процесса с нарушением процесса гранулемообразования; гиперсекреция TNF α клетками крови и элементами гранулемы, напротив, инициирует деструктивные изменения в ткани легких [Гергерт В.Я. и соавт., 1995; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Cavalcanti Y.V. et al., 2012].

В результате проведенного исследования *in vitro* было установлено увеличение базальной секреции TNF α эозинофильными гранулоцитами только у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией. У больных ТЛ без эозинофилии уровень секреции TNF α соответствовал аналогичным параметрам у здоровых доноров (табл. 33). Полученные данные укладываются в представления об эозинофил-активирующих свойствах данного цитокина, способного продлевать время пребывания эозинофильных гранулоцитов в циркуляции путем усиления 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 эозинофилов ($r=-0,75$, $p<0,05$). Примечательно, что туберкулезная инфекция характеризуется повышенной продукцией TNF α мононуклеарными лейкоцитами крови, альвеолярными макрофагами, макрофагами из плеврального экссудата и другими клетками, что в большинстве случаев соответствует неблагоприятной динамике инфекционного процесса [Гергерт В.Я. и соавт., 1995; Herbein H, Brien W.A., 2000]. Это согласуется с более выраженным характером изменений базальной секреции TNF α эозинофилами крови у пациентов с ИТЛ в сочетании с эозинофилией крови, выделяющих лекарственно-резистентные штаммы МБТ (табл. 36).

Наряду с провоспалительными медиаторами эозинофильные гранулоциты секретируют цитокины, опосредующие гуморальные реакции иммунитета. Ключевым цитокином, направляющим дифференцировку Th0 в Th2-лимфоциты, является IL-4. В синергизме с IL-13 данный цитокин осуществляет широкий спектр эффектов: активирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, «запускает» у последних гены, контролирующие синтез IgE и IgG, стимулирует экспрессию генов МНС класса I и адгезивных молекул, ингибирует продукцию IFN γ и др. [Кашкин К.П., 1998; Кетлинский С.А., 2002; Pritchard D.I. et al., 2004]. В свою очередь, другой медиатор гуморального иммунного ответа - IL-5 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 их трансформации в плазматические клетки) иммуноглобулинов различных классов [Woerly G. et al., 1999; Lacy P., Moqbel R., 2000]. Согласно данным В.Я. Гергерт и соавт. [1999], течение туберкулезной инфекции сопровождается увеличением количества и активацией В-лимфоцитов в крови, повышением синтеза IgG, IgM, IgA и концентрации циркулирующих иммунных комплексов. Некоторые исследователи отмечают также повышенное содержание IgE в сыворотке крови при туберкулезе, коррелирующее с тяжестью

заболевания, указывая на способность определенных микобактериальных белков, иммунодоминантных по IgE-ответу, оказывать стимулирующее влияние на Th2-клетки, одновременно угнетая продукцию Th1-цитокинов [Авдеенко В.Г., 2002]. Данный факт согласуется с результатами ряда работ, авторы которых описывают повышенный уровень продукции IL-4, IL-5, IL-6 и других факторов гуморального иммунитета при туберкулезной инфекции [Гергерт В.Я. и соавт., 1999; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Чурина Е.Г. и соавт., 2012; Колобовникова Ю.В. и соавт., 2012].

Как показали результаты проведенных нами исследований, спонтанная секреция IL-5 эозинофильными гранулоцитами периферической крови оказалась достоверно выше у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров и пациентов с туберкулезной инфекцией без эозинофилии (табл. 31). 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]. Кроме этого, M. Vidyarani et al. [2006] показали, что у лиц с генетически детерминированной гиперсекрецией IL-4 клетками крови отмечается повышенная восприимчивость к туберкулезу.

В ходе экспериментальных исследований можно оценить не только базальную секрецию медиаторов, отражающую «фоновое» состояние функциональной активности клеток, но и индуцированную митогенами продукцию, которая свидетельствует о резервной реактивности клеточных элементов. В настоящем исследовании мы оценивали способность эозинофильных гранулоцитов секретировать изучаемые цитокины при добавлении в культуральную суспензию клеток вакцинного штамма BCG.

В результате исследования было установлено достоверное повышение уровня BCG-индуцированной *in vitro* секреции IL-5 и TNF α у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией, уровень BCG-индуцированной продукции IL-2 увеличивался лишь у пациентов с диссеминированной формой ТЛ (табл. 31, 32, 33). Выявленные изменения свидетельствует, на наш взгляд, о повышенной резервной 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.

На сегодняшний день не существует единого мнения, касающегося влияния эозинофильных гранулоцитов (в условиях их продолжительной циркуляции) 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 протекания противотуберкулезного ответа, определяющего благоприятное течение туберкулезного процесса, 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 и с учетом формы заболевания и чувствительности возбудителя к ПТП.

Основу патогенеза туберкулезной инфекции составляют сложные механизмы взаимодействия клеток врожденного и адаптивного иммунитета с возбудителем [Симбирцев А.С., 2011; Чепель Э. и соавт., 2008]. Элементами первой линии защиты макроорганизма от МБТ являются клетки врожденного иммунитета

(макрофаги, дендритные клетки, $\gamma\delta$ T-лимфоциты, эозинофилы и др.), участвующие в распознавании и презентации антигенов, инициации развития иммунного ответа, а также в непосредственной эрадикации возбудителя [Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М. и соавт., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2011; Сахно Л.В., Черных Е.Р., 2012]. Вовлечение эозинофильных гранулоцитов в противотуберкулезный иммунитет подтверждено экспериментами *in vitro* [Hogan S.P., 2006; Hogan S.P. et al., 2008; Speirs R.S. et al., 2009; Legrand F. et al., 2009]. Особенностью этих клеток является то, что они сочетают в себе свойства врожденного и приобретенного иммунного ответа, осуществляют иммунорегуляторные функции. Дисбаланс цитокинов, секретируемых клетками врожденного иммунитета, детерминирует направленность иммунного ответа по пути доминирования отдельных субпопуляций Th-лимфоцитов (Th1, Th2, Th9, Th17 или Treg). В свою очередь, главными регуляторами адаптивного иммунного ответа при ТЛ являются Th1-лимфоциты, ответная реакция которых на распознавание антигенных детерминант определяет форму иммунного ответа с преобладанием клеточных реакций или выработки иммуноглобулинов.

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]. При этом различные клинкоморфологические варианты туберкулезной инфекции сопровождаются неодинаковыми изменениями показателей иммунного ответа. При ИТЛ чаще формируется классический Th1-зависимый ответ, тогда как при ДТЛ преобладают реакции Th2-опосредованного иммунного ответа. В случае фиброзно-кавернозного варианта инфекции исследователи отмечают развитие Т-клеточной анергии либо формирование слабо выраженного иммунного ответа с преобладанием цитокинов Th2-лимфоцитов [Левашов Ю.Н., Репин Ю.М., 2008; Лядова И.В. и соавт., 2009; Чурина Е.Г., 2012]. Установлен факт нарушения баланса механизмов супрессии и активации антигенспецифического иммунного ответа при различных формах ТЛ [Сахно Л.В. и соавт., 2010; Чурина Е.Г., 2012].

Ключевыми клетками иммунной системы, обеспечивающими формирование специфического ответа макроорганизма на антиген, являются лимфоциты. Изменение содержания лимфоцитов в периферической крови отражает состояние общей реактивности иммунной системы и, несмотря на существование современных методов лабораторной диагностики заболеваний, составляет основу постановки диагноза и оценки степени тяжести патологического процесса [Хаитов Р.М. и соавт., 2009]. В современной литературе представлены многочисленные сведения о количественных изменениях лимфоцитов крови при туберкулезной инфекции, при этом большинство авторов отмечает преобладание лимфоцитопении в фазу разгара болезни [Воронкова О.В. и соавт., 2007; Master S. et al., 2008; Филинюк О.В., 2011; Чурина Е.Г., 2012].

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 (табл. 37). При этом относительное содержание лимфоцитов у пациентов данных групп (за исключением ИТЛ с эозинофилией) снижалось на фоне увеличения общего количества лейкоцитов в крови, характерного для всех обследованных больных ТЛ. Анализируя содержание лимфоцитов в крови в зависимости от чувствительности МБТ к ПТП, было установлено достоверное увеличение их абсолютного числа у больных ЛЧ ИТЛ без эозинофилии (табл. 39).

Согласно данным литературы, лимфоцитоз при ТЛ является проявлением лимфотропности МБТ, способных инициировать гиперплазию элементов лимфоидной ткани. Однако данные изменения в большей степени характерны для первичного заражения МБТ, в то время как впервые выявленный ТЛ у пациентов, включенных в настоящее исследование, скорее представляет собой манифестацию болезни после длительного латентного периода [Мишин В.Ю. и соавт., 2004; Воронкова О.В. и соавт., 2007]. Установленное нами увеличение числа лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ с эозинофилией может быть результатом активирующего влияния цитокинов гуморального звена иммунного ответа (IL-5,

IL-4, CCL11 и др.), способных усиливать пролиферацию различных популяций лимфоцитов.

Примечательно, что отдельные субпопуляции лимфоцитов вносят различный вклад в формирование специфического иммунного ответа при туберкулезной инфекции. Так, $CD4^+$ Th1-лимфоциты секретируют цитокины, усиливающие хемотаксис, поглотительную и переваривающую активность макрофагов и цитотоксических лимфоцитов; $CD8^+$ Т-лимфоциты, способны оказывать прямое цитотоксическое действие на клетки, инфицированные микобактериями; регуляторные Т-клетки за счет секреции иммуносупрессорных биомолекул опосредуют развитие вторичной иммунологической недостаточности. Участие В-лимфоцитов в иммунопатогенезе ТЛ связано с трансформацией их в плазматические клетки и непосредственным синтезом антител, которые, по мнению отдельных авторов, лишены протективности [Маянский А.Н., 2001].

В большинстве случаев развитие ТЛ сопровождается ослаблением клеточного звена иммунного ответа, проявляющимся дефицитом лимфоцитов, экспрессирующих маркеры клеточной дифференцировки CD3, CD4 и CD8 [Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009]. При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у всех больных ТЛ независимо от наличия эозинофилии было зарегистрировано статистически значимое снижение относительного количества клеток, несущих общий популяционный маркер Т-лимфоцитов - CD3. При этом абсолютное содержание Т-лимфоцитов в крови снижалось только при ДТЛ с эозинофилией и без нее (табл. 40).

Согласно результатам других исследователей, диссеминированный вариант ТЛ характеризуется более выраженными изменениями клеточного звена иммунного ответа [Воронкова О.В. и соавт., 2007; Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009]. По мнению ученых, снижение содержания $CD3^+$ Т-лимфоцитов в крови при ТЛ является проявлением Т-клеточного дефицита, сопровождающего развитие специфического гранулематозного воспаления, связанного с угнетением формирования антиген-специфичных Т-лимфоцитов или с быстрой их элиминацией в очаг воспаления, либо с индукцией их апоптоза [Воронкова О. В. и соавт., 2007].

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 и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 40). Считается, что практически все клетки В-онтогенетического ряда несут на своей поверхности молекулы CD20 [Чередеев А.Н. и соавт., 1999], определение экспрессии которых позволяет учитывать популяцию В-лимфоцитов в целом от пре-В-лимфоцитов до плазматических клеток. Последние играют существенную роль в реализации противотуберкулезного иммунитета за счет синтеза антител, которые нейтрализуют токсины, опсонизируют бактерии, участвуют в механизме антителозависимой клеточной цитотоксичности и др. [Аутеншлюс А.И. и соавт., 2004]. В литературе приводятся многочисленные данные о том, что течение туберкулезной инфекции сопровождается увеличением в крови числа В-лимфоцитов, повышением синтеза иммуноглобулинов и концентрацией иммунных комплексов [Железникова Г. Ф., 2006; Соболюк Н.В. и соавт., 2011; Kumar D., Rao K.V., 2011; Welin A., Lern M., 2012]. Установленное в нашем исследовании увеличение абсолютного числа лимфоцитов, экспрессирующих CD20-антиген, у больных ТЛ с эозинофилией свидетельствует о более выраженной активации гуморального звена иммунной системы в условиях длительного пребывания эозинофилов в крови. У пациентов данных групп наблюдения в крови и супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов *in vitro* были установлены высокие уровни IL-5 - 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, иммуноглобулины различных классов обнаруживаются в периферической крови при любых формах ТЛ, однако их соотношение не всегда соответствует классической схеме иммунного ответа и зависит от многих факторов. Так, иммуноглобулины класса М первыми нарабатываются в гуморальных реакциях иммунитета, опсонизируют бактерии, активируют белки системы комплемента, что определяет их антибактериальную функцию. По данным В.Г.

Авдеенко и соавт. [2002], титры IgM повышаются до диагностически значимых величин только на раннем этапе развития ТЛ и снижаются к началу 10 суток от начала болезни. В свою очередь, иммуноглобулины класса А играют важную роль в связывании бактериальных белков, обеспечивая эффективную реализацию механизмов «первой линии защиты» на слизистых оболочках и тем самым вносят определенный вклад в формирование гуморального звена иммунного ответа [Аутеншлюс А.И. и соавт., 2004]. Клинико-диагностическое значение при ТЛ отводится определению иммуноглобулинов класса G, в норме составляющих основную массу противотуберкулезных антител, нарабатываемых плазматическими клетками в ходе развития иммунного ответа на *M. tuberculosis* [Аутеншлюс А.И. и соавт., 2004; Воронкова О.В. и соавт., 2007].

Анализ суммарного пула специфичных 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 (табл. 54). Изучение общего пула противотуберкулезных антител у всех больных ТЛ не позволяет однозначно интерпретировать однонаправленный характер выявленных изменений. Учитывая, что Т-лимфоциты способны посредством IL-1, IL-2, TNF α усиливать экспрессию генов, контролирующих синтез μ -цепей иммуноглобулинов (IgM), и за счет IFN γ регулировать переключение синтеза иммуноглобулинов и выработку IgG, то установленный нами дефицит CD3⁺ лимфоцитов объясняет низкий уровень антител. Вместе с тем, у больных ТЛ вне зависимости от наличия эозинофильной реакции крови может отмечаться недостаточность защитного потенциала плазматических клеток, проявляющаяся угнетением их иммуноглобулинсинтезирующей функции при одновременном повышении числа В-лимфоцитов. В целом, образование антител при ТЛ имеет вторичное значение, а основное место в антимиkobактериальном иммунном ответе занимают все же клеточно-опосредованные реакции.

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

Известно, что в раннем периоде инфекции преобладают IL-1, IL-4, IL-6 и TNF α , которые активируют реакции врожденного иммунитета при участии макрофагов, дендритных клеток, натуральных киллеров, НКТ-лимфоцитов, $\gamma\delta$ Тклеток, эозинофилов и др. [Bean A. et al., 1999; Russo D. et al., 2000]. Далее формируется антигенспецифический ответ CD4⁺ Т-лимфоцитов при непосредственном влиянии IL-2, стимулирующего процессы пролиферации и дифференцировки клеток, и IFN γ , секреция которого опосредована действием IL-12 и IL-18 (активаторы секреции), а также IL-4, IL-10 и TGF β (ингибиторы секреции) [Tascon R. et al., 1998; Bermudez L., Petrofsky M., 1999; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Чурина Е.Г., 2012].

IFN γ обладает широким спектром свойств, включая активацию микробицидности 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. Способность IFN γ усиливать наработку факторов рекрутирования макрофагов в очаг воспаления обуславливает участие этого цитокина в формировании туберкулезной гранулемы. Сведения литературы, касающиеся содержания IFN γ в крови при ТЛ, неоднозначны. По данным одних авторов, у больных деструктивными формами ТЛ уровень изучаемого медиатора в крови снижен в сравнении с таковым у здоровых туберкулинпозитивных доноров [Шкарин А.В. и соавт., 2008]. Другие исследователи, напротив, регистрируют высокую продукцию IFN γ клетками крови на фоне благоприятного течения туберкулезной инфекции [Новицкий В.В. и соавт., 2005; Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2010].

В результате проведенного нами исследования было зарегистрировано статистически значимое снижение концентрации IFN γ в крови у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией; у пациентов с ТЛ без эозинофилии уровень данного медиатора был сопоставимым с контролем (табл. 43). 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 $IFN\gamma$ может выступать в качестве фактора, способствующего развитию эозинофилии в крови и тканях при ТЛ. Так, J. Kirman et al. [2000] показали, что при заражении *M. bovis* мышей с нокаутом гена *IFNG* (неспособных продуцировать $IFN\gamma$ или экспрессировать специфический рецептор) отмечалось увеличение количества эозинофилов в периферической крови и накопление их в ткани легкого. Это, по мнению авторов, связано с отсутствием эффектов ингибирующего влияния $IFN\gamma$ на секрецию клетками крови основных медиаторов альтернативного пути регуляции иммунного ответа. Кроме этого, авторы указывают на повышенную восприимчивость экспериментальных животных к росту микобактерий и полагают, что именно эозинофилия и эозинофилы вносят свой негативный вклад в этот процесс. В настоящем исследовании была установлена отрицательная корреляционная связь между содержанием $IFN\gamma$ и количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической крови при ТЛ ($r=-0,87$, $p<0,05$). Комментируя этот факт уместно подчеркнуть, что именно гипосекреция $IFN\gamma$ клетками крови и тканей может приводить к нарушению гибели и элиминации микобактерий, заболевание приобретает затяжное течение и характеризуется неблагоприятным прогнозом [Шкарин А.В. и соавт., 2008].

В свете изложенного не вполне объяснимо достоверное увеличение секреции $IFN\gamma$, обнаруженное нами у больных ЛУ ДТЛ без эозинофилии, по сравнению со здоровыми донорами и лекарственно-чувствительным вариантом инфекции (табл. 44). В исследованиях Е.Г. Чуриной [2012] уровень базальной и VCG-индуцированной продукции $IFN\gamma$ оказался достоверно выше у больных с лекарственно-чувствительным вариантом болезни по сравнению с МЛУ ТЛ. Выявленное увеличение секреции $IFN\gamma$ мононуклеарами крови при ТЛ, вне зависимости от клинической формы болезни, реакции Манту и чувствительности МБТ к ПТП, по мнению автора, является универсальным механизмом реагирования иммунной системы на возбудитель, проявляющий интерферогенную активность [Чурина Е.Г., 2012]. Вместе с тем, гиперпродукция $IFN\gamma$, которую многие исследователи рассматривают в качестве благоприятного

прогностического признака, не совсем согласуется с более выраженным характером изменений этого параметра при ДТЛ, который в сочетании с устойчивостью возбудителя к ПТП характеризуется значительной депрессией показателей клеточно-опосредованного иммунного ответа и ассоциирован с деструктивным компонентом воспаления.

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 изучении *in vitro* продукции IL-2 мононуклеарными лейкоцитами при ТЛ в ходе проведенного исследования было установлено снижение базальной продукции медиатора только у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией, в то время как угнетение VCG-индуцированной секреции IL-2 отмечалось у всех пациентов. Наиболее выраженное снижение продукции IL-2 было зарегистрировано при ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 45). По данным многих исследователей, дефицит продукции IL-2 клетками крови регистрируется в период активно развивающейся туберкулезной инфекции [Гергерт В.Я. и соавт., 1999; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Чурина Е.Г., 2012]. Снижение сывороточного уровня IL-2 авторы интерпретируют результатом токсического влияния *M. tuberculosis* на процессы синтеза и высвобождения цитокина иммунокомпетентными клетками [Кашкин К.П., 1998; Кетлинский С.А., 2002; Фрейдлин И.С., 2001]. В то же время, гипопродукция IL-2 мононуклеарами крови при ТЛ может быть проявлением функциональной анергии Т-клеток, ассоциированной с тяжестью заболевания [Сахно Л.В. и соавт., 2004; Черных Е.Р. и соавт., 2002]. По данным литературы, при МЛУ ТЛ продукция IL-2 претерпевает более существенное снижение, чем при ЛЧ ТЛ. Однако в настоящем исследовании такая зависимость в отношении стимулированной секреции цитокина прослеживалась только в случае ЛУ ДТЛ без эозинофилии. Напротив, при лекарственно-резистентном ИТЛ и ДТЛ с

эозинофилией и ИТЛ без эозинофилии показатели BCG-индуцированной *in vitro* секреции IL-2 оказались выше, чем при лекарственно-чувствительном варианте заболевания (табл. 47). Полученные результаты, по всей видимости, отражают многогранность функционального потенциала IL-2 в формировании адаптивного противотуберкулезного иммунитета.

Известно, что IL-2 выполняет не только функции ростового фактора, где его действие дублируется другими цитокинами, но и осуществляет контроль за гиперактивацией иммунной системы посредством стимуляции дифференцировки особой популяции регуляторных Т-клеток (Treg-лимфоцитов) [Malek T., Bayer A., 2004]. На сегодняшний день хорошо изучены две разновидности Treg – естественные тимические (Tnr) и индуцированные на периферии (Tir) [Liston A. et al., 2008; Lee D.C. et al., 2010; Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. Показано, что Treg несут различные поверхностные и внутриклеточные молекулы, благодаря которым осуществляется их иммуносупрессорный эффект. За счет мембранной молекулы CD25 (α -цепь рецептора к IL-2) Treg конкурентно связывают IL-2, снижая активацию им других клеток; экспрессия внутриклеточного транскрипционного фактора Foxp3 также вовлечена в снижение клеточной активности. Отмечена высокая экспрессия поверхностной молекулы CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) – негативного активатора сигнальной трансдукции, посредством которой Treg взаимодействуют с молекулами костимуляции CD80/CD86 и блокируют формирование сигнала, необходимого для образования иммунного синапса. Еще одним иммуносупрессорным механизмом 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 TGF β) [Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011].

В зависимости от экспрессии маркерных молекул выделяют регуляторные клетки с иммунофенотипами CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻. При этом максимально реализуют свой супрессорный потенциал только Foxp3-позитивные Treg, а именно CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ и CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ Т-лимфоциты [Pop S.M. et al., 2005; Ярилин А.А., Донецкова

А.Д., 2006; Хайдуков С.В., Зурочка А.В., 2011; Чурина Е.Г. и соавт., 2012]. По мнению многих исследователей, избыточная активность Treg обуславливает снижение интенсивности протективного иммунного ответа в борьбе макроорганизма с *M. tuberculosis* [Chen X. et al., 2003; Lee D.C. et al., 2010]. В частности, E.G. Churina et al. [2012] показали, что ведущую роль в формировании иммуносупрессии при ИТЛ и ДТЛ, а также при фиброзно-кавернозной форме ТЛ играют $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg, количество которых оказалось повышенным в крови у больных ТЛ независимо от чувствительности возбудителя к ПТП.

Учитывая изложенное выше, нами проводилась оценка содержания регуляторных Т-клеток, экспрессирующих молекулу Foxp3, у больных ТЛ в зависимости от числа эозинофилов в периферической крови. Установлено достоверное повышение количества $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg у всех пациентов с ТЛ по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров, тогда как содержание CD25-негативных Treg-лимфоцитов, экспрессирующих внутриклеточный маркер Foxp3, возрастало только у больных ЛУ ДТЛ без эозинофилии (табл. 51). Обращало на себя внимание достоверное увеличение численности Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, при этом более выраженные изменения количества Treg были обнаружены при лекарственно-устойчивом варианте заболевания (табл. 52).

Следует отметить, что у больных ТЛ с эозинофилией увеличение содержания $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 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]. Противоречивый характер результатов, по мнению исследователей, может быть обусловлен селективным действием IL-2 на определенные стадии формирования (пролиферации, дифференцировки, активации) Treg, либо объясняться специфичностью действия цитокина в разных концентрациях [Чурина Е.Г., 2012]. Однако, как указывалось выше, у больных ДТЛ в сочетании с эозинофилией периферической крови был зарегистрирован высокий уровень IL-2 в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов *in vitro*. Гиперсекреция IL-2

эозинофильными гранулоцитами в условиях их длительного пребывания в циркуляции, по-видимому, может обуславливать повышенное содержание $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-лимфоцитов при ТЛ. 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 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg при ЛУ ДТЛ ($r=0,79$, $p<0,05$). Факт взаимосвязи продукции изучаемого медиатора с количеством эозинофилов в крови подтверждается также наличием отрицательной корреляции между абсолютным числом эозинофильных гранулоцитов в крови и спонтанной секрецией IL-2 мононуклеарными лейкоцитами крови при ДТЛ ($r=-0,63$, $p<0,01$).

Таким образом, ТЛ в сочетании с эозинофилией крови сопровождается накоплением в циркуляции клеток, обладающих иммуносупрессорными свойствами. 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 TGF β) [Takahashi T. et al., 1998; Sakaguchi S. 2004; Nishikawa H., Sakaguchi S., 2005; Чурина Е.Г., 2012]. Посредством указанных механизмов Treg способны подавлять продукцию макрофагами и дендритными клетками провоспалительных цитокинов, а также ингибировать дифференцировку Th0-клеток в Th1-лимфоциты, инициировать дисбаланс противотуберкулезного иммунного ответа [Miyara M., Sakaguchi S., 2011].

Ключевым цитокином Th2-зависимого иммунного ответа является IL-4, 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, показано, что IL-4 наряду с IL-2 участвует в регуляции баланса механизмов активации и супрессии иммунного ответа: с одной стороны, он стимулирует процесс трансформации моноцитов крови в макрофаги, а с другой, – ингибирует функции активированных макрофагов, влияя на их антигенпрезентирующую функцию [McCoy M.E. et al., 2010]. Некоторые авторы высказывают предположения о

способности IL-4 ингибировать апоптоз Treg, повышая тем самым супрессорную активность клеток [Pace L. et al., 2005].

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, в то время как у больных без эозинофилии повышение базальной секреции цитокина регистрировалось только при лекарственно-устойчивом варианте ДТЛ (табл. 45, 48). При этом уровень VSG-индуцированной продукции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* достоверно повышался только при ДТЛ, как с эозинофилией, так и без таковой. У пациентов с ДТЛ, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы МБТ, базальный уровень медиатора значимо превышал аналогичный параметр у больных ЛЧ ДТЛ. В целом, наиболее выраженные изменения продукции IL-4 *in vitro* были зарегистрированы при диссеминированном варианте инфекции в сочетании с лекарственной устойчивостью возбудителя, что укладывается в существующие концепции иммунопатогенеза данной формы ТЛ. Известно, что при ДТЛ формируется главным образом специфический Th2-опосредованный иммунный ответ в сочетании с активацией В-лимфоцитов и их иммуноглобулинсекреторной функции [Перельман М.И., 2007; Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009].

Следует отметить, что у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией была установлена положительная корреляция между базальной гиперсекрецией IL-4 мононуклеарными лейкоцитами *in vitro* и концентрацией IL-5 в крови ($r=0,88$, $p<0,05$ и $r=0,74$, $p<0,05$ при ИТЛ и ДТЛ соответственно). Как уже упоминалось ранее, IL-5 (медиатор гуморального иммунного ответа) обладает не только эозинофил-активирующими свойствами, но и, совместно с IL-4, стимулирует пролиферацию и дифференцировку В-лимфоцитов, индуцирует продукцию плазматическими клетками цитокинов и иммуноглобулинов различных классов [Woerly G. et al., 1999; Lacy P., Moqbel R., 2000]. У пациентов данных групп установлено 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 длительного пребывания эозинофилов в крови. Высокая активность последних в отношении секреции IL-5 обосновывает способность эозинофилов вносить вклад в общий цитокиновый дисбаланс при туберкулезной инфекции.

Еще один цитокин, который регулирует направленность иммунного ответа при ТЛ, - IL-10. Ранее полагали, что IL-10 избирательно подавляет пролиферацию и дифференцировку Th1-лимфоцитов и относили его к медиаторам гуморального иммунитета. В настоящее время доказано, что IL-10 угнетает продукцию цитокинов всеми клонами Т-лимфоцитов-хелперов (Th1, Th2 и Th17), а также снижает функции АПК [Симбирцев А.С., 2011]. Установлено значимое влияние IL-10 в отношении подавления реакций врожденного и антигенспецифического иммунного ответа [Ярилин А.А., 2010; Симбирцев А.С., 2011; Чурина Е.Г., 2012]. В связи с этим, данный цитокин обозначают как уникальный ингибитор иммунного ответа. При ТЛ IL-10 способен вызвать «иммунное отклонение», переводя Th1-зависимый в Th2-зависимый иммунный ответ за счет снижения секреции IL-2 и IFN γ Т-лимфоцитами-хелперами и, напротив, гиперпродукции ими IL-4. Многочисленными исследованиями описана определяющая роль IL-10 в угнетении пролиферативного потенциала Т-лимфоцитов периферической крови у больных ТЛ [Блум Б.Р., 2002; Мейл Д. и соавт., 2007; Ito Y. et al., 2009]. С гиперпродукцией IL-10 связывают формирование туберкулиновой анергии при ИТЛ [Сахно Л.В. и соавт., 2005; Новицкий В.В. и соавт., 2007; 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. 49). 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 (табл. 5) базальная секреция IL-10 соответствовала

контрольным значениям, а BCG-индуцированный уровень секреции этого медиатора достоверно превышал таковой у здоровых лиц (табл. 49). Это, по всей видимости, свидетельствует о высокой реактивности антигенспецифических клонов $CD4^+$ Т-лимфоцитов, в числе которых присутствуют Treg, способные секретировать IL-10.

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 $IFN\gamma$ в крови и IL-2 в интактной культуре мононуклеарных лейкоцитов *in vitro*. Учитывая, что IL-10 – это не единственный антагонист цитокинов клеточного звена иммунитета ($IFN\gamma$, 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].

Основными клетками-продуцентами TGF β являются регуляторные Т-лимфоциты с иммунофенотипом $CD4^+CD25^-Foxp3^+$, в то же время его секретируют моноциты, макрофаги, тромбоциты, хондроциты, остеобласты и др. [Хаитов Р.М., 2009; Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. При действии TGF β с участием костимулирующих молекул в периферических органах иммунной системы осуществляется преобразование Т-лимфоцитов-хелперов с фенотипом $CD4^+CD25^-$ в Treg, экспрессирующие $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ [Ярилин А.А., 2010; Хаитов Р.М. и соавт., 2011]. Маркерными структурами, отражающими появление иммуносупрессорной субпопуляции регуляторных Т-клеток, является экспрессия ими поверхностных молекул CD25, CTLA-4 и внутриклеточного фактора *Foxp3* [Ярилин А.А., 2010]. TGF β способен также модулировать функциональную активность Treg за счет повышения экспрессии гена *FOXP3* [Pop S. et al., 2005]. Наряду с иммуносупрессивными свойствами TGF β опосредует противовоспалительные эффекты с усилением процессов регенерации. Он способен блокировать дифференцировку хелперных и эффекторных клеток, угнетая синтез последними цитотоксических продуктов. Кроме этого, TGF β

подавляет синтез и секрецию цитокиновых молекул клетками, участвующими в реализации Th1-зависимого иммунного ответа, такими как макрофаги и Т-лимфоциты. В литературе продемонстрировано ингибирующее влияние TGF β на фагоцитоз МБТ и их разрушение в макрофагах [Ерохин В.В., Ельшанская М.П., 1990]. Роль TGF β в иммунопатогенезе ТЛ у человека подчеркивается результатами Е.Г. Чуриной и соавт. [2011], выявившими повышение продукции данного медиатора мононуклеарными лейкоцитами крови у больных ТЛ с мультилекарственной резистентностью МБТ к ПТП.

Согласно результатам, полученным в настоящем исследовании, уровень продукции TGF β в культуре мононуклеарных лейкоцитов при ТЛ менялся неоднозначно (табл. 46). У больных ТЛ в сочетании с эозинофилией крови регистрировалось достоверное увеличение базальной секреции TGF β вне зависимости от клинической формы инфекции. При ИТЛ без эозинофилии базальный уровень TGF β , напротив, снижался, а при диссеминированном варианте ТЛ - соответствовал контрольным значениям. Анализ спонтанной продукции TGF β с учетом чувствительности МБТ к ПТП позволил зарегистрировать максимальное увеличение базальной и индуцированной секреции *in vitro* данного медиатора при ЛУ ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 50). Последний тезис согласуется с результатами других исследований, в которых показано, что высокий уровень TGF β отмечался у больных ДТЛ и ФКТЛ, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы МБТ [Чурина Е.Г. и соавт., 2011].

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 и 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. Как указывалось выше, в крови у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, увеличивается число Treg с фенотипом CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, которые обладают максимальной супрессорной активностью. 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 предположительным механизмом иммуносупрессии при ТЛ с эозинофилией является формирование своеобразного «супрессорного» микроокружения в очаге туберкулезного воспаления за счет секреции Treg-лимфоцитами и эозинофильными гранулоцитами специфического фермента индолил-2,3-диоксигеназы (IDO) [Odemuvwa S.O., 2004]. Данные о роли IDO в создании супрессорного режима иммунорегуляции появились в литературе сравнительно недавно и были обозначены как «механизм деградации триптофана» [Shevach E.M., 2012; Shevach E.M., Davidson T., 2012; Urazova O.I. et al., 2013]. По сведениям литературы, активность IDO индуцируется бактериальными липополисахаридами (через TLR-2), а также IFN γ преимущественно в стромальных, дендритных и естественных регуляторных Т-клетках. Физиологическая роль IDO состоит, как полагают, в ограничении чрезмерно выраженного ответа на патогены, реализуемом по принципу «петли отрицательной обратной связи»: сильная реакция клеток приводит к интенсивной выработке IDO, которая впоследствии сдерживает реакцию Т-клеток и вызывает состояние анергии последних [Ярилин А.А., 2010]. Механизм действия IDO заключается в превращении триптофана в кинуренин. Дефицит триптофана (аминокислоты, в наибольшей степени лимитирующей синтез белков) и накопление кинуренина обуславливают блок клеточного цикла (нарушается переход клеток из фазы G₁- в S-фазу), активацию апоптоза Th1-лимфоцитов и, как следствие, Th1/Th2-дисбаланс иммунного ответа с преобладанием Th2 [Odemuvwa S.O., 2004].

В то же время, небезынтересными, на наш взгляд, представляются современные данные, свидетельствующие о новых концептуальных возможностях Treg в аспекте устранения патологических эффектов Th2-опосредованного иммунного воспаления. Показано, что Treg способны подавлять экспериментальное аллергическое воспаление дыхательных путей у мышей,

инфицированных *Trichinella spiralis*, за счет угнетения продукции Th2-цитокинов, пролиферации клеток-предшественниц эозинофилов в костном мозге и их аккумуляции в бронхоальвеолярном тракте [Aranzamendi C. et al., 2013]. Другие авторы, добавляя в культуру клеток бронхоальвеолярного лаважа *Polygyrus heligmosomoides*, регистрировали повышение численности Treg при снижении числа Th1-, Th2-, Th17-лимфоцитов и продукции ими цитокинов соответствующего профиля [McSorley H.J., 2012]. Кроме того, отмечалось снижение количества Th2-клеток, опосредующих направленность иммунного ответа по гуморальному пути (нивелировалось активирующее воздействие IL-5 на эозинофилы, снижалась продукция IgE). Анализируя указанные факты, можно сделать вывод о возможной роли Treg в регуляции и поддержании иммунного баланса между различными клетками и молекулами как врожденного, так и адаптивного иммунитета.

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. Показана способность эозинофильных гранулоцитов секретировать иммунорегуляторные цитокины и опосредовать формирование иммуносупрессии при туберкулезной инфекции. 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. Наиболее часто первыми клиническими симптомами ТЛ выступают неспецифические проявления интоксикации: слабость, повышенная утомляемость

(особенно в утренние часы), повышение температуры тела, ночные поты, снижение массы тела [Перельман М.И., 2001; Блум Б.Р., 2002; Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007; Филинюк О.В., 2011; Хантаева Н.С. и соавт., 2011]. Интоксикационный синдром часто сопровождает деструктивные формы ТЛ, для которых характерны распространенные поражения легких с выходом в циркуляцию продуктов распада тканей. Кроме этого, прогрессирующее течение ТЛ характеризуется несостоятельностью местных защитных реакций, в результате чего гранулематозное воспаление продолжает развиваться, локально повышается концентрация цитокинов с последующим их выходом в кровоток, где их действие проявляется на системном уровне [Кашкин К.П., 1998; Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008; Хаитов Р.М., 2009; Ярилин А.А., 2010]. К цитокинам, обладающим «эндокринным» эффектом, относятся такие провоспалительные факторы, как IL-1, IL-6 и TNF α , концентрация которых нередко повышена при ТЛ. Данные цитокины имеют множество центральных эффектов, приводящих к изменению некоторых поведенческих реакций, индукции медленно-волнового сна, утрате аппетита. Для TNF α определена способность активировать ТАГ-липазу адипоцитов, что обуславливает существенную потерю массы тела при ТЛ вплоть до развития кахексии [Салина Т.Ю., Морозова Т.И., 2010]. Одним из важных свойств вышеперечисленных цитокинов является пирогенность – способность воздействовать на нейроны терморегуляторного центра преоптической области гипоталамуса с запуском целого каскада изменений, сопровождающихся наработкой простагландинов, сдвигом установочной точки и увеличением температуры «ядра» тела [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Часто температурная реакция при ТЛ варьирует в диапазоне 37,5 - 38,0 °С, характерен ремиттирующий характер лихорадки с суточным колебанием температуры более 1 °С. Установлено увеличение температуры тела до фебрильных величин в вечернее время с некоторым снижением в утренние часы. При этом лихорадка часто сопровождается обильным (профузным) потоотделением в ночное время [Перельман М.И., 2001; Ерохин В.В., 2009; Филинюк О.В., 2011]. Высокая температура тела в сочетании с ночными потами указывает на быстро

развивающийся процесс и является неблагоприятным признаком туберкулезной инфекции.

В результате проведенного исследования у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови, в значительном проценте случаев ($54,28 \pm 4,91$ %) регистрировалась фебрильная температура тела, в то время как при ТЛ без эозинофилии субфебрильная и фебрильная температурная реакции обнаруживались в равном соотношении (табл. 55).

Такие клинические проявления ТЛ, как слабость и повышенная утомляемость, были зарегистрированы у $100,00 \pm 0,00$ % пациентов, независимо от наличия эозинофильной реакции крови. Потеря аппетита и дефицит массы тела обнаруживались у каждого второго-третьего пациента в группах больных ТЛ с эозинофилией и без таковой (табл. 55).

Практически у каждого обследованного нами пациента наблюдался кашель – неизменный признак туберкулезной инфекции. Известно, что ТЛ сопровождается нарушением мукоцилиарного клиренса, в связи с чем кашлевой рефлекс – вспомогательный механизм очистки дыхательных путей, позволяет поднимать мокроту из альвеол в вышележащие отделы [Перельман М.И., 2001; Блум Б.Р., 2002; Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007]. Как правило, кашель при туберкулезной инфекции сопровождается обильным выделением мокроты, характер которой может быть от слизистого до гнояного, что определяется выраженностью патологического процесса в легких.

У всех больных ТЛ вне зависимости от количества эозинофилов в периферической крови регистрировалось выделение мокроты, приблизительно у одной пятой части обследованных пациентов течение специфического процесса осложнялось кровохарканьем, возникающим вслед за приступом длительного надсадного кашля (табл. 55). Выраженность кровохарканья может быть различной: от незначительной примеси крови в мокроте до легочного кровотечения, что является следствием выраженного туберкулезного воспаления с вовлечением в деструкцию стенок капилляров либо крупного сосуда соответственно [Перельман М.И., 2001; Хантаева Н.С. и соавт., 2011; Шилова М.В. и соавт., 2012].

При деструктивных формах ТЛ нередко регистрируется одышка (при нагрузке или в состоянии покоя), обусловленная уменьшением дыхательной поверхности легких. Осложнения туберкулезного процесса в виде появления одышки при физической нагрузке регистрировались в группах больных ТЛ с практически одинаковой частотой случаев: у $66,67 \pm 4,42$ % пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и у $53,91 \pm 4,67$ % больных ТЛ без эозинофилии. Количество пациентов, предъявляющих жалобы на одышку в покое и боль в грудной клетке, при ТЛ было также сопоставимым и не различалось в зависимости от наличия эозинофилии крови (табл. 55).

В целом, при ТЛ острый характер начала заболевания с преобладанием симптомов интоксикационного синдрома (повышение температуры тела, ночные поты, слабость, повышенная утомляемость, снижение или отсутствие аппетита, потеря массы тела) в сочетании с симптомами воспалительных изменений в легочной ткани (кашель, выделение мокроты, кровохарканье, одышка) отражает значительный характер распространенности процесса в легких. Так, у пациентов с ТЛ независимо от наличия эозинофилии преобладали поражения более 4-х сегментов в пределах одного легкого. Вовлечение в патологический процесс обоих легких регистрировалось у $42,51 \pm 4,20$ % больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и у $34,43 \pm 3,24$ % больных ТЛ без эозинофилии. При исследовании качественных характеристик процесса у пациентов с туберкулезной инфекцией, как с эозинофилией, так и без таковой, были обнаружены видимые очагово-инfiltrативные изменения в легочной ткани (табл. 56).

Несмотря на то, что у всех пациентов отмечался деструктивный процесс в легких, в ходе настоящего исследования были зарегистрированы значимые отличия качественных признаков патологического процесса в зависимости от количества эозинофилов в крови. Так, у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, достоверно чаще регистрировались участки деструкции в ткани легких по сравнению с группой больных ТЛ без эозинофилии ($p < 0,01$). Статистически значимые различия были обнаружены и при анализе темпов рассасывания очагово-инfiltrативных поражений в легких. У пациентов с ТЛ, ассоциированным с эозинофилией, преобладали средний и медленный темпы рассасывания очагово-

инфильтративных изменений в легочной ткани, тогда как у больных ТЛ без эозинофилии достоверно чаще выявлялись быстрые и средние темпы восстановления ткани легких (табл. 56). Остаточные изменения в ткани легких в виде очагов фиброза обнаруживались у всех больных ТЛ вне зависимости от наличия эозинофилии в периферической крови. Более выраженный характер изменений в легочной ткани, зарегистрированных при ТЛ с эозинофилией, позволяет думать о возможной реализации агрессивного потенциала эозинофильных гранулоцитов, способных в избытке накапливаться в крови и тканях.

Однако сравнительный анализ рентгенологических проявлений туберкулезной инфекции в зависимости от числа эозинофилов в крови корректнее проводить с учетом вариантов клинических форм заболевания, отличающихся не только патогенетически, но и особенностями реализации иммунного ответа.

Известно, что для инфильтративного варианта ТЛ характерно формирование инфильтрата в месте внедрения МБТ с последующей гиперэргической реакцией легочной ткани, обуславливающей выраженные экссудативные явления с дефицитом клеточных элементов в очаге воспаления [Кошечкин В.А., Иванова З.А., 2007; Блум Б.Р., 2002]. Состояние иммунного ответа при ИТЛ характеризуется высоким пролиферативным ответом лимфоцитов с сохранением их функциональной активности, определяется высокий уровень провоспалительных цитокинов и низкий уровень противотуберкулезных антител [Аверченков В.М. и соавт., 1998; Воронкова О.В. и соавт., 2007; Kuz'mina I.K., Gubkina M.F., 2009; Уразова О.И. и соавт., 2010].

В рентгеноморфологической картине ДТЛ превалируют экссудативные реакции с формированием воспалительных очагов, сливающихся между собой, образование участков затемнения с развитием каверн и участков распада в легких [Филинюк О.В., 2011]. Обязательным фактором, необходимым для развития диссеминированного туберкулеза, является бактериемия [Перельман М.И., 2007; Филинюк О.В., 2011]. Иммунный ответ при ДТЛ сопровождается снижением функциональной активности Т-лимфоцитов, моноцитов и полиморфноядерных лейкоцитов на фоне усиленного метаболизма В-лимфоцитов с гиперпродукцией

ими иммуноглобулинов [Howard J., Zwilling S., 1999; Аутеншлюс А.И. и соавт., 2004; Чепель Э. и соавт., 2008; Воронкова О.В. и соавт., 2010].

При исследовании особенностей течения ТЛ на фоне высокого числа эозинофилов в крови с учетом формы заболевания нами была изучена частота встречаемости инфильтративной и диссеминированной формы инфекции среди больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией и без таковой. Статистический анализ показал, что среди больных ТЛ с эозинофилией инфильтративный вариант заболевания встречался в $60,78 \pm 4,86$ % случаев, а диссеминированный - в $39,32 \pm 4,39$ %, что было сопоставимым с аналогичными параметрами при ТЛ без эозинофилии (ИТЛ – у $60,87 \pm 4,57$ % пациентов и ДТЛ – у $39,13 \pm 4,50$ % больных). Проведение корреляционного анализа не позволило выявить взаимосвязи эозинофильной реакции крови с клинической формой заболевания. Однако были зарегистрированы отличительные особенности рентгенологических проявлений у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой при разделении пациентов по форме заболевания.

Так, при ДТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови очаги деструкции регистрировались у $100,00 \pm 0,00$ %, тогда как у пациентов с ТЛ без эозинофилии деструктивные изменения легочной ткани обнаруживались лишь в $60,35 \pm 7,37$ % случаев ($p < 0,001$) (табл. 58). При ИТЛ достоверных различий в отношении обнаружения деструктивных изменений в ткани легких зарегистрировано не было (табл. 57). По результатам сравнительного анализа деструктивных поражений легочной ткани была установлена достоверная взаимосвязь между наличием деструкции в легких и эозинофилией периферической крови ($r_a = 0,50$, $p < 0,05$ при ИТЛ и $r_a = 0,71$, $p < 0,05$ при ДТЛ).

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. Э.Х. Анаев и соавт. [1994] показали, что эозинофильные лейкоциты посредством секреции катионных протеинов и пероксидазы вызывали деструктивные изменения бронхиального эпителия и

альвеол у больных бронхиальной астмой. Другие авторы регистрировали признаки изъязвления корнеального эпителия в сочетании с отложением эозинофильных белков в очаге воспаления при офтальмопатологии атопической природы [Trosme S.D. et al., 2003]. При гастроэзофагальной рефлюксной болезни, ассоциированной с эозинофилией, было обращено внимание на повреждение и фиброзирование задней стенки пищевода, сопровождающиеся активным диапедезом эозинофилов и их дегрануляцией [Norvell J.M. et al., 2007; Lucendo A.J. et al., 2007; Miyoshi R. et al., 2007]. У больных с идиопатическим гиперэозинофильным синдромом регистрировались признаки васкулита, фиброзирующего эндокардита с застойными явлениями, а также фиброзные изменения в легочной ткани [Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Vaandrup U., 2012]. Выявленные альтеративные реакции исследователи объясняют цитотоксическим действием главного основного протеина и эозинофильного катионного протеина на эндотелий, ткани эндокарда и легких [Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005; Абдулкадыров К.М. и соавт., 2006; Rothenberg M.E., Hogan S.P., 2006; Vaandrup U., 2012]. Кроме этого, факт деструкции различных тканей при гиперэозинофилиях некоторые исследователи ассоциируют с высоким уровнем TNF α , цитотоксическая активность которого опосредована активацией эозинофильной пероксидазы [Бережная Н.М., 2000]. Последний тезис позволяет интерпретировать возможные механизмы деструктивных изменений в легочной ткани при ТЛ, ассоциированном с эозинофилией. У больных ТЛ с эозинофилией установлена гиперсекреция TNF α *in vitro* на фоне снижения активности пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах. Обнаружена отрицательная корреляционная связь 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 деструктивных изменений в тканях сопряжено с замедлением репаративных явлений и положительной динамики развития инфекционного процесса. Учитывая деструктивный потенциал эозинофильных

гранулоцитов, процесс восстановления туберкулезных изменений при ТЛ в сочетании с эозинофилией крови может быть существенно замедлен. Эозинофилы, как и другие полиморфноядерные лейкоциты, способны выделять протеолитические ферменты, «расплавляющие» ткань легкого, что препятствует обратному развитию туберкулезного воспаления. Инволюция туберкулезного процесса с полным рассасыванием патологических очагов без каких-либо остаточных изменений и элиминацией МБТ из организма – явление довольно редкое. Процесс «заживления» туберкулезного воспаления в большинстве случаев сопровождается постепенным рассасыванием очагов и инфильтратов, уплотнением зоны казеозного некроза, уменьшением площади полостей распада и закрытием каверн и, в итоге, формированием вокруг гранулемы соединительнотканной капсулы [Перельман М.И., 2001]. Сроки появления положительных рентгеноморфологических признаков болезни у пациентов с ТЛ условно разделяют на быстрые (развивающиеся в течение первых 3 месяцев лечения), средние (наступающие в период от 3 до 6 месяцев) и медленные (при которых восстановление происходит через 6 и более месяцев).

Анализ темпов 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 темпы рассасывания, а при ДТЛ, ассоциированном с эозинофилией, в 100,00±0,00 % случаев регистрировались медленные темпы восстановления легочной ткани (табл. 57, 58). У пациентов с ИТЛ без эозинофилии достоверно чаще регистрировались быстрые темпы рассасывания очагово-инфильтративных поражений легких, а у больных ДТЛ без эозинофилии - медленные темпы восстановления. 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 $r_a=0,87$, $p<0,01$ ДТЛ).

Рассасывание инфильтратов с трансформацией грануляций в соединительную ткань может привести к развитию фиброзных изменений (остаточных посттуберкулезных изменений) в ткани легких. Эти изменения могут быть

представлены рубцом, инкапсулированным или кальцинированным фиброзным очагом, участком очагового или диффузного пневмофиброза. 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, синтезирующие коллаген, эластин и другие компоненты внеклеточного матрикса. Ключевым фактором, способным активировать метаболизм соединительной ткани и одновременно способствовать быстрому восстановлению исходной структуры органа, является TGF β [Ярилин А.А. и соавт., 2010]. Уникальный характер его биологической активности особенно ярко проявляется в регуляции восстановительных реакций в ткани легких [Кетлинский С.А., Симбирцев А.С., 2008]. Известно, что TGF β синтезируется практически всеми клетками организма, однако ключевыми клетками-продуцентами медиатора считаются регуляторные Т-лимфоциты и эозинофильные гранулоциты.

В ходе проведенного нами исследования при ТЛ установлено увеличение числа эозинофильных гранулоцитов и секреции TGF β *in vitro*. Это указывает на возможность развития более выраженных фиброзных изменений при ТЛ, течение которого сопряжено с увеличением числа эозинофильных гранулоцитов в крови. У больных ТЛ с эозинофилией несколько чаще выявлялись фиброзные изменения в легочной ткани по сравнению с группой больных без эозинофилии, однако при проведении статистической обработки данных достоверной взаимосвязи между наличием фиброза и эозинофилией крови выявлено не было (табл. 57, 58).

Следует отметить, что наличие эозинофилии крови при ТЛ связывают не только с прогрессирующим течением патологического процесса. По мнению некоторых авторов, гемическая эозинофилия чаще выявляется у больных ТЛ, выделяющих лекарственно-резистентные штаммы МБТ. Феномен лекарственной устойчивости возбудителя к ПТП является результатом одной или нескольких спонтанных хромосомных мутаций в геноме МБТ, возникающих при проведении неадекватных лечебных мероприятий [Тунгусова О.С., Марьяндышев А.О., 2001;

Хрулева Т.С., 2001; Тунгусова О.С. и соавт., 2005]. Наиболее часто среди пациентов с ТЛ регистрируются варианты полирезистентности (устойчивость к 2 и более ПТП, но не к сочетанию изониазида и рифампицина) и мультирезистентности (устойчивость одновременно к изониазиду, рифампицину и любому другому препарату) [Сафарян М.Д., 2008; Зиновьев И.П. и соавт., 2009; Филинюк О.В., 2011]. При проведении сравнительного анализа частоты встречаемости ЛУ ТЛ среди обследованных нами пациентов было установлено, что доля больных, выделяющих лекарственно-устойчивые штаммы МБТ, составила $37,00 \pm 4,44$ % при ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и $38,12 \pm 3,74$ % - при ТЛ без эозинофилии. В свою очередь, ЛЧ-вариант инфекции отмечался у $63,00 \pm 5,54$ % больных ТЛ с эозинофилией и у $61,88 \pm 4,13$ % пациентов, в крови которых число эозинофилов соответствовало норме. При оценке лекарственной устойчивости возбудителя в целом по группе больных ЛУ ТЛ было обнаружено, что у $84,61$ % из них регистрировалась устойчивость к двум препаратам (изониазиду и стрептомицину), в $15,39$ % случаев - МЛУ (устойчивость к изониазиду, рифампицину и стрептомицину). У больных ЛУ ТЛ в сочетании с эозинофильной реакцией крови прослеживались аналогичные тенденции. В результате проведенного нами корреляционного анализа взаимосвязи эозинофильной реакции крови с устойчивостью МБТ к ПТП выявлено не было. Следовательно, вероятность развития эозинофилии крови не зависит от варианта (ЛЧ или ЛУ) ТЛ.

Всем пациентам, поступившим в стационар, с впервые выявленным ТЛ до получения данных теста на лекарственную устойчивость, назначали лечение по первому режиму химиотерапии, включающему изониазид, рафампицин, пиразинамид и этамбутол (стрептомицин). После регистрации у больных резистентности МБТ к изониазиду и рифампицину стандартная схема лечения подвергалась пересмотру с заменой ПТП на альтернативные, к которым чувствительность МБТ была сохранена. Продолжительность курса интенсивной терапии у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, составила $3,53 \pm 1,02$ мес., а у пациентов с ТЛ без эозинофилии - $4,0 \pm 1,0$ мес, при этом достоверной разницы между данными параметрами выявлено не было. Отсутствовали статистически значимые различия в сроках пребывания пациентов с ТЛ в

стационаре: $150,5 \pm 31,87$ дней находились на стационарном лечении больные ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, у больных ТЛ без эозинофилии данный показатель составил $145,16 \pm 40,23$ дней.

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

В период проведения интенсивной фазы химиотерапии больным в стационаре прекращение бактериовыделения по микроскопии мазка мокроты и результатам посева составило $81,34 \pm 6,85$ % и $77,24 \pm 4,60$ % соответственно у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (при $79,27 \pm 4,13$ % и $74,66 \pm 5,30$ % у больных ТЛ без эозинофилии ($p > 0,05$)). В 75 % случаев ТЛ, ассоциированного с эозинофилией, негативация мокроты происходила в течение первых двух месяцев лечения. У пациентов с ТЛ, течение которого сопровождалось нормальным содержанием эозинофилов в крови, абациллирование мокроты происходило в течение трех месяцев терапии. При проведении сравнительного анализа сроков негативации мокроты в зависимости от числа эозинофильных гранулоцитов в крови при ТЛ достоверных отличий в сроках прекращения выделения МБТ зарегистрировано не было. Наблюдалась лишь тенденция к укорочению сроков абациллирования у больных ТЛ в сочетании с эозинофилией крови. Данная тенденция может быть обусловлена высокой активностью эозинофильных гранулоцитов, способных секретировать бактерицидные субстанции и осуществлять фагоцитоз бактерий, что приводит к снижению числа микробных тел в очаге гранулематозного воспаления. Так, F. Legrand et al. [2009] показали, что эозинофильные гранулоциты взаимодействуют с *M. tuberculosis* с последующим высвобождением α -дефензинов и эозинофильной пероксидазы, инициирующих деградацию клеточной стенки

бактерий. Посредством бактерицидного белка, повышающего проницаемость клеток, эозинофилы способны связывать и нейтрализовать бактериальные липополисахариды [Calafat B.J. et al., 1998]. По мнению S. Yousefi et al. [2008, 2012], антибактериальная роль эозинофилов может быть опосредована экспульсией митохондриальной ДНК.

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 составляло $(0,476 \pm 0,099) \times 10^9/\text{л}$ и $5,63 \pm 2,03$ %, что достоверно превышало нормальные значения, но было ниже соответствующего числа эозинофилов у этих больных до лечения. Обращало на себя внимание, что высокое содержание эозинофильных гранулоцитов регистрировалось лишь у $37,58 \pm 6,11$ % больных ТЛ с изначальной 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 $3,10 \pm 1,93$ %). У $66,76 \pm 10,10$ % больных ТЛ без эозинофилии содержание эозинофильных гранулоцитов в крови через 3 месяца после проведения противотуберкулезной терапии соответствовало контрольным значениям и количеству эозинофилов у пациентов данной группы до лечения. В $14,57 \pm 3,21$ % случаев ТЛ без эозинофилии на момент абациллирования регистрировалось увеличение абсолютного и относительного количества эозинофильных гранулоцитов в крови до $8,00 \pm 1,40$ % и $(0,640 \pm 0,110) \times 10^9/\text{л}$ соответственно, у $18,67 \pm 5,36$ % пациентов, напротив, обнаруживалось снижение числа эозинофильных гранулоцитов, вплоть до анэозинофилии. Среди больных ТЛ с изначально высоким числом эозинофилов в крови анэозинофилия не регистрировалась ни у одного пациента, что, скорее всего, обусловлено влиянием эозинофил-активирующих факторов, содержащихся в высоких концентрациях в периферической крови у пациентов данной группы.

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.

Заключение

Эозинофильная реакция крови регистрируется в 18 % случаев туберкулезной инфекции до проведения химиотерапии, более выраженный характер гемической эозинофилии обнаружен при лекарственно-резистентном варианте ДТЛ, сопровождающегося тяжелым прогрессирующим течением. Механизм формирования эозинофильной реакции крови опосредован гиперсекрецией клетками крови ключевых эозинофил-активирующих медиаторов (IL-5 и CCL11), а также избыточной экспрессией IL-5RA на мембране эозинофильных гранулоцитов. Носительство генотипов *CC* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5* и *GG* полиморфизма *A-384G* гена *CCL11*, ассоциированных с гиперпродукцией IL-5 и CCL11 и повышением их содержания в крови, является определяющим фактором в формировании гемической эозинофилии при ТЛ. Установлен факт генетической предрасположенности к развитию эозинофилии крови при туберкулезной инфекции.

Высокий уровень ключевых эозинофил-активирующих медиаторов обуславливает усиление экспрессии IL-5RA и CD18 - рецепторных структур, обеспечивающих длительное пребывание эозинофилов в кровотоке с последующей аккумуляцией в очаге гранулематозного воспаления. При ТЛ эозинофилы (особенно в условиях повышенного содержания в крови) характеризуются высокой фагоцитарной способностью и низкой активностью пероксидазы, что отражает возможное участие этих клеток в реализации эффекторных механизмов противотуберкулезной защиты. Иммунорегуляторный потенциал эозинофильных гранулоцитов обуславливает роль эозинофилии в формировании цитокинового дисбаланса и иммуносупрессии при туберкулезной инфекции.

При изучении особенностей течения ТЛ в зависимости от числа эозинофилов в периферической крови выявлены существенные различия основных иммунологических параметров и рентгенологических признаков заболевания. Установлено, что ТЛ, сопровождающийся эозинофильной реакцией крови, характеризуется снижением *in vitro* секреции ключевых провоспалительных цитокинов на фоне увеличения продукции медиаторов с иммуносупрессорной активностью в сочетании с повышением содержания В-лимфоцитов и

регуляторных Т-клеток в крови. Выявленные изменения указывают на доминирование иммунного Th2-ответа, что может способствовать дальнейшему развитию эозинофилии крови при туберкулезной инфекции. Дисбаланс иммунного ответа с превалированием Th2-реакций в условиях Treg-опосредованной супрессии факторов Th1-ответа при ТЛ с эозинофилией сочетается с острым началом заболевания, преобладанием деструктивных изменений в легочной ткани и замедлением темпов рассасывания очагов и инфильтратов. Это указывает на существование распространенного деструктивного процесса в легких и определяет более тяжелое течение заболевания при сочетании его с эозинофилией крови. Выраженность деструктивных изменений в ткани легких коррелирует с высвобождением эозинофильными гранулоцитами агрессивных цитотоксических факторов, что подтверждает участие эозинофилов в патогенезе ТЛ.

В целом, полученные результаты позволяют заключить, что ТЛ в сочетании с эозинофилией крови характеризуется дефицитом протективных факторов противотуберкулезного иммунитета, что в сочетании с высоким деструктивным потенциалом эозинофильных гранулоцитов, наличием деструкции и замедлением восстановительных процессов в легочной ткани является признаком отрицательной динамики инфекционного процесса.

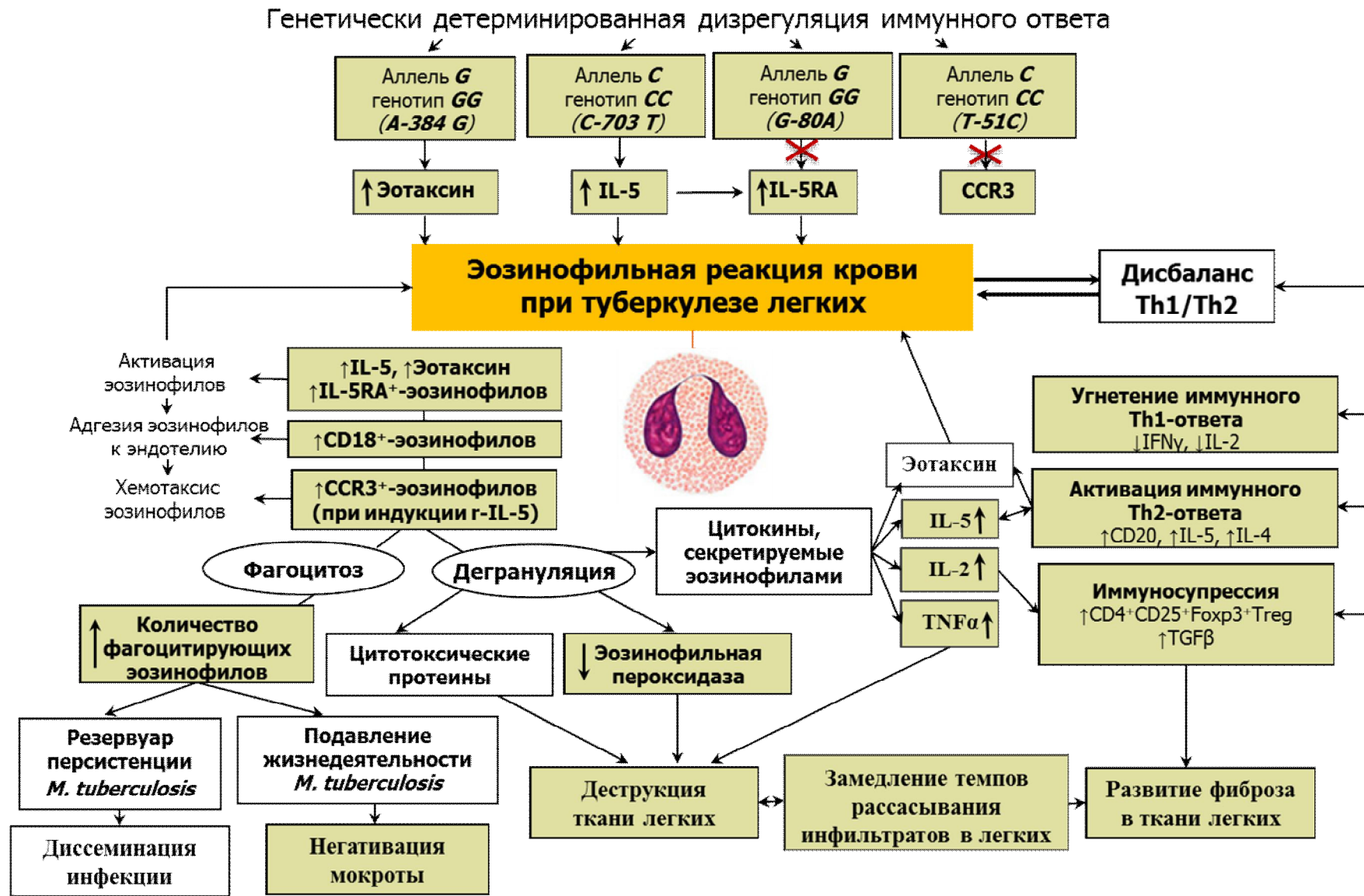


Рис. 8. Феномен эозинофилии при туберкулезе легких (по данным M.E. Rothenberg, S.P. Hogan, 2006; S.P. Hogan et al., 2008; J. Kirman et al., 2009; N.S. Linch et al., 2009; Y. Hattori et al., 2011; V. Driss et al., 2012 и результатам собственных исследований (выделено серым цветом))

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⁺ Трег-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 литературы

1. Абдулкадыров, К.М. Клиническая гематология: Справочник / К.М. Абдулкадыров. - Спб: Питер, 2006. - 448 с.
2. Авдеев, М.Г. Молекулярные механизмы развития инфекционного процесса / М.Г. Авдеев, В.В. Лебедев, М.Г. Шубич // Клиническая лабораторная диагностика. - 2007. - № 4. - С. 15-22.
3. Авдеенко, В.Г. Противотуберкулезные IgE-антитела (II часть). Исследование концентрации при различных формах туберкулеза / В.Г. Авдеенко // Проблемы туберкулеза. - 2002. - № 3. - С. 45-48.
4. Авербах, М.М. Роль липидных компонентов *M. tuberculosis* в образовании туберкулезной гранулемы / М.М. Авербах // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2011. - № 2. - С. 15-19.
5. Авербах, М.М. Туберкулезная гранулема. Современный взгляд на иммуногенез и клеточный состав / М.М. Авербах // Туберкулез и болезни легких. - 2010. - Т. 87, № 6. - С. 3-9.
6. Аверченков, В.М. Вторичная иммунная недостаточность и ее коррекция миелопидом у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких / В.М. Аверченков, В.Д. Ломаченков, Н.И. Федотова // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 2. - С. 20-22.
7. Активность фагоцитирующих клеток периферической крови у больных туберкулезом легких до и в процессе противотуберкулезной терапии / Н.А. Земляная, О.В. Филинюк, О.И. Уразова, О.В. Воронкова // Медицинская иммунология. - 2006. - Т. 8, № 2-3. - С. 266.
8. Анаев, Э.Х. Эозинофилы и эозинофилии / Э.Х. Анаев // Пульмонология и аллергология. - 2002. - № 3. - С. 15-18.
9. Антитела к антигенам микобактерий у больных туберкулезом легких / А.И. Аутеншлюс, Ю.В. Туманов, А.Н. Шкунов и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2004. - № 11. - С. 37-40.
10. Апт, А.В. Туберкулез: патогенез, иммунный ответ и генетика хозяина / А.В. Апт, Т.К. Кондратьева // Молекулярная биология. - 2008. - Т. 42, №5. - С. 880-890.

11. Ассоциация полиморфных маркеров генов IL5, CCL26 и CCL5 с развитием атопической бронхиальной астмы / О.Е. Воронько, Е.В. Дмитриева-Здорова, Е.А. Латышева и др. // Российский аллергологический журнал. - 2010. - № 6. - С. 20-24.
12. Балабанова, Я.М. Преобладание штаммов M.tuberculosis семейства Beijing и факторы риска их трансмиссии в Самарской области / Я.М. Балабанова, В.В. Николаевский, М. Радди // Проблемы туберкулеза. - 2006. - Т. 2. - С. 31-37.
13. Баранов, В.С. Геном человека и гены «предрасположенности» (введение в предиктивную медицину) / В.С. Баранов, Е.В. Баранова, И.Н. Иващенко. - СПб.: Интермедика, 2000. - 272 с.
14. Белобородова, Э.И. Случай эозинофильной пневмонии у больной описторхозом / Э.И. Белобородова, Т.А. Колосовская // Клиническая медицина. - 1986. - № 12. - С. 109-110.
15. Бережная, Н.М. Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте / Н.М. Бережная // Аллергология и иммунология. - 2000. - Т. 1, № 1. - С. 45-61.
16. Бережная, Н.М. Эозинофилы, базофилы и иммуноглобулин Е в противоопухолевой защите / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. - 2005. - № 6 (1). - Р. 38-49.
17. Боровиков, В.В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В.В. Боровиков. - СПб., М., Харьков., Минск, 2001. - 360 с.
18. Бородулин, Б.Е. Иммунный гомеостаз при туберкулезе легких / Б.Е. Бородулин // Казанский медицинский журнал. - 2003. - Т. 84, №2. - С. 97-99.
19. Вахидова, Г.А. Иммунологические механизмы патогенеза туберкулеза / Г.А. Вахидова, В.В. Еремеев, А.М. Убайдуллаев // Проблемы туберкулеза. - 1991. - № 5. - С. 69-71.
20. Волкова, М.А. Клиническая онкогематология / М.А. Волкова. - М.: Медицина, 2001. - 572 с.
21. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии: В 2 т. / Под ред. А.И. Воробьева. - М., 2002. - Т. 1. - 280с.

22. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии: В 3т. / Под ред. А.И. Воробьева 3е издание переработанное и дополненное. - М.: Ньюдиализ, 2003. - Т.2. - 269 с.
23. Воробьев, А.А. Иммунология и аллергология: учебное пособие для студентов медицинских вузов / А.А. Воробьев, А.С. Быкова, А.В. Караулов. - М.: Практическая медицина, 2006. - 288 с.
24. Гашенко, А.В. Комплексное социально-эпидемиологическое изучение распространения туберкулеза в современных условиях / А.В. Гашенко // Сибирский медицинский журнал. - 2008. - № 8. - С. 60-62.
25. Гиперэозинофильный вариант Ph⁺ положительного хронического миелолейкоза / Н.Д. Хорошко, Р.А. Мокеева, А.Г. Туркина и др. // Терапевтический архив. - 1998. - № 7. - С. 30-36.
26. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям / И.А. Гончарова, М.Б. Фрейдин, А.А. Рудко и др. // Вестник Вавиловского общества генетиков и селекционеров. - 2006. - Т. 10, № 3. - С. 540-552.
27. Генетика атопии: современное состояние / М.Б. Фрейдин, Е.Ю. Брагина, Л.М. Огородова, В.П. Пузырев // Вестник ВОГиС. - 2006. - Т. 10, № 3. - С. 492-503.
28. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов / Ф.Ф. Ризванова, О.И. Пикуза, Р.А. Файзуллина и др. // Практическая медицина. - 2010. - № 6 (45). - С. 41-43.
29. Генетический полиморфизм иммуногенной сигнальной системы / В.Н. Цыган, А.М. Иванов, Т.А. Камилова и др. // Журнал инфектологии. - 2011. - Т. 3, № 2. - С. 21-27.
30. Генетический полиморфизм при инфекционных болезнях / Г.Г. Онищенко, А.Б. Белевитин, В.Н. Цыган и др. // Вестник российской военно-медицинской академии. - 2008. - № 3. - С. 16-37.
31. Генотипические характеристики *M.tuberculosis* - возбудителей остро прогрессирующего деструктивного туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, Р.Р. Хасанова и др. // Бюллетень сибирской медицины. - 2011. - №1. - С.12-17.

32. Гершанович, М.Л. Применение IL-2 (пролейкина, алдеслейкина) в онкологической практике / М.Л. Гершанович // Вопросы онкологии. - 2003. - №49 (6). - С. 776-783.
33. Гольдберг, Е.Д. Методы культуры ткани в гематологии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.П. Шахов. - Томск: изд-во Томского ун-та, 1992. - 272 с.
34. Гриншпун, Г.Д. Эозинофилы и эозинофилии / Г.Д. Гриншпун, Ю.Е. Виноградова // Терапевтический архив. - 1983. - № 10. - С. 87-90.
35. Громова, А.Ю. Полиморфизм генов семейства IL-1 человека / А.Ю. Громова, А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2005. - № 2. - С. 5-12.
36. Джальчинова, В.Б. Эозинофилы и их роль в патогенезе аллергических заболеваний / В.Б. Джальчинова, Г.М. Чистяков // Российский вестник пренатологии и педиатрии. - 1999. - № 5. - С. 42-45.
37. Дисфункции макрофагов, генерированных из моноцитов крови больных туберкулезом легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, С.Д. Никонов и др. // Бюллетень СО РАМН. - 2010. - Т.30, № 2. - С. 101-108.
38. Дорожкова, И.Р. Возбудитель туберкулеза: история открытия и изучения / И.Р. Дорожкова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2012. - № 1. - С. 3-14.
39. Еремеев, В.В. Взаимодействие макрофаг-микобактерия в процессе реакции микроорганизма на туберкулезную инфекцию / В.В. Еремеев, К.Б. Майоров // Проблемы туберкулеза. - 2002. - № 3. - С. 54-57.
40. Ерохин, В.В. Молекулярные, субклеточные и клеточные механизмы патогенеза туберкулезного воспаления легких / В.В. Ерохин // Саратовский научно-медицинский журнал. - 2009. - Т. 5, № 2. - С. 267-269.
41. Ерохин, В.В. Морфологические проявления вторичного иммунодефицита / В.В. Ерохин, М.П. Ельшанская // Проблемы туберкулеза. - 1990. - №2. - С. 65-70.
42. Ерохин, В.В. О некоторых механизмах патогенеза туберкулеза / В.В. Ерохин // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2009. - № 7. - С. 3-8.

43. Ерохин, В.В. Современные представления о туберкулезном воспалении / В.В. Ерохин, З.С. Земскова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2003. - № 3. - С. 11-21.
44. Железникова, Г.Ф. Иммуноглобулин Е: биологическая роль при инфекционных заболеваниях / Г.Ф. Железникова // Медицинская иммунология. - 2002. - № 4 (4-5). - С. 515-534.
45. Защитно-адаптивные механизмы при туберкулезной инфекции / В.А. Павлов, И.Д. Медвинский, Ю.П. Чугаев и др. // Фтизиатрия и пульмонология. - 2011. - № 1. - С. 42-54.
46. Зеленова, О.В. Болезнь Ходжкина: предполагаемые причины и иммунологические аспекты / О.В. Зеленова, Н.А. Терентьева, Е.Г. Зеленова // Нижегородский медицинский журнал. - 2002. - №2. - С. 73-77.
47. Земляная, Н.А. Клинико-иммунологические особенности туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью: Автореферат дисс...канд. мед. наук. - Томск, 2007. 339 с.
48. Идиопатический и симптоматический гиперэозинофильные синдромы (сравнительная характеристика на основе 14 наблюдений) / Н.Д. Хорошко, Р.А. Мокеева, А.Г. Туркина и др. // Терапевтический архив. - 1997. - № 7. - С. 26-33.
49. Изменчивость полиморфных вариантов генов интерлейкинов и их рецепторов у представителей четырех этнических групп Сибирского региона / А.Н. Кучер, Н.П. Бабушкина, Е.Ю. Брагина и др. // Медицинская генетика. - 2009. - № 10. - С. 43-52.
50. Имангулова, М.М. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких / М.М. Имангулова, А.Р. Бикмаева, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. - 2004. - Т. 4, № 11 - С. 505-511.
51. Имангулова, М.М. Полиморфизм кластера гена интерлейкина 1 у больных туберкулезом легких / М.М. Имангулова, А.Р. Бикмаева, Э.К. Хуснутдинова // Цитокины и воспаление. - 2005. - Т. 4, № 1. - С. 36-41.
52. Иммунопатология туберкулёза лёгких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис // Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. - 194 с.
53. Иммунный ответ у больных хроническим описторхозом/ Н.В. Карбышева, А.Н. Трунов, И.Н. Киушкина и др. // Консилиум. - 2001. - № 6. - С. 15-18.

54. Индуцированная продукция цитокинов в культуре мононуклеарных клеток периферической крови здоровых лиц / В.И. Коненков, В.В. Авдошина, И.Г. Ракова и др. // Медицинская иммунология. - 2006. - Т. 8, № 4. - С. 517-522.
55. К вопросу о так называемом плазмоклеточном лейкозе с системным полиорганным специфическим поражением / Р.А. Мокеева, Е.М. Абакумов, О.А. Дягилева и др. // Гематология и трансфузиология. - 2001. - Т. 46, № 2. - С. 14-20.
56. Калмыкова, Е.В. Исследование ассоциаций полиморфных маркеров генов интерлейкинов с хроническим гломерулонефритом: Автореф. дис. канд. биол. наук / Е. В. Калмыкова. - Москва, 2009. - 19 с.
57. Казак, Т.И. Морфологические различия очагов туберкулезного воспаления, отражающие иммунную реактивность организма / Т.И. Казак // Проблемы туберкулеза. - 2003. - № 3. - С. 36-40.
58. Каминская, Г.О. Некоторые метаболические характеристики циркулирующих фагоцитов у пациентов с различными вариантами легочного туберкулеза / Г.О. Каминская, Р.Ю. Абдуллаев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2002. - № 3. - С. 38-425.
59. Кашкин, К.П. Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность / К.П. Кашкин // Клиническая лабораторная диагностика. - 1998. - № 11. - С. 21-32.
60. Кетлинский, С.А. Роль Т-хелперов типов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета / С.А. Кетлинский // Иммунология. - 2002. - Т. 23, № 2. - С. 77-79.
61. Кетлинский, С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. - СПб.: ООО «Издательство Фолиант», 2008. - 552 с.
62. Кетлинский, С.А. Th17 - новая линия дифференцировки Т-хелперов: обзор данных / С.А. Кетлинский // Цитокины и воспаление. - 2009. - Т. 8, № 2. - С. 3-15.
63. Клиническое значение исследования экспрессии гена IL-5 при бронхиальной астме / И.С. Попова, А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова и др. // Пульмонология. - 2004. - № 4. - С. 54-59.

64. Коненков, В.И. Структурные основы и функциональная значимость аллельного полиморфизма генов цитокинов человека и их рецепторов / В.И. Коненков, М.В. Смольникова // Медицинская иммунология. - 2003. - Т. 5, № 1-2. - С. 11-28.
65. Корецкая, Н.М. Эпидемиология, патогенез и патоморфология остро прогрессирующего туберкулеза легких / Н.М. Корецкая // Сибирский медицинский журнал. - 2011. - № 2. - С. 5-8.
66. Коровина, Н.А. Клинические аспекты эозинофилии у детей / Н.А. Коровина, И.Н. Захарова, Л.П. Гаврюшова // Российский педиатрический журнал. - 2002. - № 2. - С. 42-46.
67. Кофиади, И.А., Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфическая ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой / И.А. Кофиади, Д.В. Ребриков // Генетика. - 2006. - Т. 42, № 1. - С. 22-32.
68. Кошечкин, В.А. Туберкулез: пособие для студентов медицинских вузов / В.А. Кошечкин, З.А. Иванова. - М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2007. - 304 с.
69. Краснов, В.А. Бактерицидная терапия больных туберкулезом / В.А. Краснов, И.Г. Урсов // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2004. - № 3. - С. 21-27.
70. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1980. - 309 с.
71. Левашова, Т.В. Минорная субпопуляция гамма/дельта Т-клеток у пациентов старших возрастных групп: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2008. 24 с.
72. Левашова, Т.В. Определение гамма/дельта Т-лимфоцитов при иммунном ответе на *Helicobacter pylori* / Т.В. Левашова // Человек и его здоровье. СПб, 2007, 242с.
73. Левашов, Ю.Н. Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу / Ю.Н. Левашов, Ю.М. Репин. - Санкт-Петербург: ЭЛБИ-СПб, 2008. - 544 с.
74. Лиманский, А.П. Компьютерный анализ инвертированных повторов в геноме микобактерий туберкулеза / А.П. Лиманский, О.Ю. Лиманская, Ю.Л. Волянский // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2004. - № 5 - С. 48-52.
75. Литвинова, Л.С. Клеточные механизмы больших эозинофилий крови / Л.С. Литвинова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий. - Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. - 137 с.

76. Лорие, Ю.Ю. Опухолевая прогрессия и вопросы биологии лимфогранулематоза / Ю.Ю. Лорие // Терапевтический архив. - 2000. - № 7. - С. 76-80.
77. Лядова, И.В. Реакции Т-клеточного иммунитета при туберкулезе: экспериментальные и клинические исследования / И.В. Лядова, В.Я. Гергерт // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2009. - № 7. - С. 9-18.
78. Макинский, А.И. Антимикробная активность фагоцитов крови у больных туберкулезом и саркоидозом органов дыхания / А.И. Макинский, С.Е. Борисов, Л.Ю. Петрова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2004. - № 9. - С. 42-45.
79. Маянский, А.Н. Туберкулез (микробиологические и иммунопатогенетические аспекты) / А.Н. Маянский // Иммунология. - 2001. - № 2. - С. 53-63.
80. Медико-социальные особенности течения множественно лекарственно-устойчивого инфильтративного туберкулеза легких / О.В. Филинчук, А.К. Стрелис, О.И. Уразова, Н.А. Земляная, Л.Н. Буйнова, Д.Ю. Щегерцов // Актуальные вопросы лечения туберкулеза различных локализаций: научные труды Всероссийской науч. практ. конф. - СПб., 2008. - С.287-291.
81. Меньшиков, В.В. О разработке стандартизированных технологий клинических лабораторных исследований / В.В. Меньшиков, Л.М. Пименова // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 8. - С. 55-56.
82. Механизмы нарушения кооперации эозинофилов и иммуноцитов при формировании больших эозинофилий крови / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - № 2. - С. 52-61.
83. Механизмы нарушения цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и иммуноцитов при формировании феномена эозинофилии / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, С.Б. Ткаченко, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Иммунология. - 2007. - Т. 28, № 2. - С. 123-127.

84. Мишин, В.Ю. К вопросу об оптимизации химиотерапии больных с впервые выявленным туберкулезом легких / В.Ю. Мишин // Клинич. микробиол. и антимикроб. терапия. - 2002. - Т. 4, № 1. - С. 4-15.
85. Мишин, В.Ю. Клинические проявления и особенности лечения остро прогрессирующих форм туберкулеза легких в современных условиях / В.Ю. Мишин, В.И. Чуканов // Российский медицинский Журнал. - 2000. - № 5. - С. 13-17.
86. Мишин, В.Ю. Побочное действие противотуберкулезных препаратов при стандартных и индивидуализированных режимах химиотерапии / В.Ю. Мишин, В.И. Чуканов, Ю.Г. Григорьев. - М.: Изд-во «Компьютербург», 2004. - 205 с.
87. Мишин, В.Ю. Химиотерапия туберкулеза легких / В.Ю. Мишин // Пульмонология. - 2008. - № 3. - С. 5-14.
88. Мишин, В.Ю. Эффективность лечения туберкулеза легких, вызванного микобактериями с множественной лекарственной устойчивостью / В.Ю. Мишин, В.И. Чуканов, И.А. Васильева // Проблемы туберкулеза. - 2002. - № 12. - С. 18-21.
89. 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. - 2012. - № 5. - С. 58-62.
90. Мордык, А.В. Частота и патогенез неблагоприятных побочных реакций на противотуберкулезные препараты / А.В. Мордык // Вестник Современной Клинической медицины. - 2010. - Т. 3, № 1. - С. 16-21.
91. Морозова, В.Т. Хронические лейкозы / В.Т. Морозова, С.А. Луговская, М.Е. Почтарь // Клиническая лабораторная диагностика. - 2000. - № 12. - С. 25-43.
92. Мякишева, Т.В. Впервые выявленный туберкулез легких у больных молодого возраста с различным характером лекарственной устойчивости возбудителя / Т.В. Мякишева, В.Ю. Мишин // Туберкулез и болезни легких. - 2011. - Т. 88, № 5. - С. 66-67.
93. Намазова, Л.С. Роль цитокинов в формировании аллергических реакций у детей / Л.С. Намазова, В.А. Ревякина, И.И. Балаболкин // Педиатрия. - 2000. - № 1. - С. 56-65.

94. Нарушение механизмов активной иммуносупрессии при беременности, осложненной гестозом / Н.А. Хонина, А.В. Дударева, М.А. Тихонова и др. // Бюллетень СО РАМН. - 2003. - № 3. - С. 73-76.
95. Нечаева, О.Б. Социально-экономические аспекты туберкулеза / О.Б. Нечаева, М.Г. Шестаков, Е.И. Скачкова // Проблемы управления здравоохранения. - 2011. - № 6. - С. 16-22.
96. Нижегородова, Д.Б. Гамма-дельта-Т-лимфоциты: общая характеристика, субпопуляционный состав, биологическая роль и функциональные особенности / Д.Б. Нижегородова, М.М. Зафранская // Медицинская иммунология. - 2009. - Т. 11, № 2/3. - С. 115-130.
97. Никонов, С.Д. Эффективность локорегиональной и лимфотропной интермиттирующей химиоиммунотерапии туберкулеза легких / С.Д. Никонов, А.П. Огиренко, Г.В. Мостовая // Проблемы туберкулеза. - 2002. - № 4. - С. 9-12.
98. Новицкий, В.В. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до и на фоне химиотерапии / В.В. Новицкий, В.А. Синицына, А.К. Стрелис // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2005. - № 6. - С. 36-39.
99. Об эпидемиологической ситуации по туберкулезу в Томской области по итогам 2010 года // Материалы управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по томской области [Электронный ресурс]. URL: http://70.rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/54328/ (дата обращения 30.10.2011).
100. Озерецковская, Н.Н. Органная патология в острой стадии тканевых гельминтозов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E, G4 и факторов, индуцирующих иммунный ответ / Озерецковская Н.Н. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2000. - № 3. - С. 3-6.
101. Ольшанская, Ю.В. Хромосомные перестройки при гемобластозах, сопровождающихся гиперэозинофилией / Ю.В. Ольшанская, А.В. Захарова, Е.В. Домрачева // Гематология и трансфузиология. - 2005. - Т. 50, № 4. - С. 42-47.

102. Особенности иммунного дисбаланса при различных клинко-патогенетических вариантах остро прогрессирующего туберкулеза легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Бюллетень сибирской медицины. - 2010. - № 4. - С. 42-50.
103. Особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов IL1, IL4, IL5, IL6, IL10 и TNFA у европеоидного населения западной Сибири / А.В. Шевченко, О.В. Голованова, В.И. Коненков и др. // Иммунология. - 2010. - № 4. - С. 176-181.
104. Отраслевые показатели противотуберкулезной работы в 2009-2011 гг. Статистические материалы [www.mednet.ru].
105. Оценка иммунологического статуса человека при массовых обследованиях. Методические рекомендации для научных работников и врачей практического здравоохранения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин и др. // Иммунология. - 1992. - № 6. - С. 51-62.
106. Оценка специфического гуморального иммунитета у больных туберкулезом детей и подростков / Н.В. Соболюк, М.А. Плеханова, А.В. Мордык и др. // Российский педиатрический журнал. - 2011. - № 2. - С. 19-22.
107. Патология сердца при идиопатическом гиперэозинофильном синдроме / Р.А. Мокеева, Н.В. Цветаева, Е.А. Семенова и др. // Терапевтический архив. - 2000. - № 12. - С. 59-62.
108. Пащенко, М.В. Физиология клеток иммунной системы: дендритные клетки / М.В. Пащенко, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 2006. - № 6. - С. 368-378.
109. Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза у больных с впервые выявленным деструктивным туберкулезом легких / И.П. Зиновьев, Н.А. Эсаулова, В.Г. Новиков, И.А. Коковихина // Туберкулез и болезни легких. - 2009. - Т. 86, № 4. - С. 37-38.
110. Перельман, М.И. Основные итоги противотуберкулезной работы в России в 2001 г. / М.И. Перельман // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2003. - № 2. - С. 3-11.
111. Перельман, М.И. Туберкулез / М.И. Перельман, В.А. Корякин, Н.М. Протопопова. - М.: Медицина, 1990. - 304 с.

112. Перельман, М.И. Фтизиатрия / М.И. Перельман, В.А. Корякин, И.В. Богадельникова. - М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2007. - 512 с.
113. Пичугин, А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугин // Проблемы туберкулеза. - 2005. - № 12. - С. 3-7.
114. Полиморфизм генов интерлейкинов и их рецепторов: популяционная распространенность и связь с атопической бронхиальной астмой / М.Б. Фрейдин, В.П. Пузырев, Л.М. Огородова и др. // Генетика. - 2002. - Т. 38, № 12. - С. 1-9.
115. Полиморфизм генов кандидатов подверженности к туберкулезу у славянского населения Сибири: популяционное исследование / В.П. Пузырев, М.Б. Фрейдин, А.А. Рудко, А.К. Стрелис, О.В. Колоколова // Молекулярная биология. - 2002. - Т. 36, № 5. - С. 788-791.
116. Полиморфизм генов-модификаторов иммунного ответа: влияние на развитие целиакии и вариантов ее клинического течения в Томской популяции / А.А. Рудко, Е.И. Кондратьева, Г.Н. Янкина и др. // Молекулярная биология. - 2008. - Т. 42, № 1. - С. 42-49.
117. Полиморфизм одиночных нуклеотидов в генах цитокинов и их рецепторов: биологический эффект и методы идентификации / Д.Д. Абрамов, И.А. Кофиади, К.В. Уткин и др. // Иммунология. - 2011. - Т. 32, № 5. - С. 275-280.
118. Полиморфизм С-703Т гена IL5 и маркеры эозинофильного воспаления у больных бронхиальной астмой и их родственников / Л.М. Огородова, В.П. Пузырев, О.С. Кобякова и др. // Генетика. - 2003. - Т. 32, № 3. - С. 31-37.
119. Полосухин, В.В. Патологическая анатомия воспалительных заболеваний легких (ультраструктурные аспекты деструктивных и восстановительных процессов) / В.В. Полосухин - Новосибирск: Наука, 1997. - 311 с.
120. Продукция цитокинов при различных формах туберкулеза легких / Б.Е. Кноринг, А.С. Симбирцев, И.Я. Сахарова и др. // Проблемы туберкулеза. - 1998. - № 3. - С. 67-71.
121. Роль дендритных клеток в противотуберкулезном иммунитете / З.К. Хайтова, Р.Р. Хасанова, О.И. Воронкова и др. // Российский иммунологический журнал. - 2012. - Т. 6 (15), № 2. - С. 119-123.

122. Роль цитокинов и полиморфно-ядерных нейтрофилов в патогенезе бронхиальной астмы / Ю.С. Ландышев, А.В. Суров, Е.Л. Лазуткина и др. // Дальневосточный медицинский журнал. - 2008. - № 2. - С. 134-138.
123. Руководство по легочному и внелегочному туберкулезу / под ред. Ю.Н. Левашова, Ю.М. Репина. - СПб., 2008. - 544 с.
124. Салина, Т.Ю. Иммунопатогенетические механизмы в течении туберкулезной инфекции / Т.Ю. Салина, Л.Б. Худзик // Проблемы туберкулеза. - 2001. - № 8. - С. 32-34.
125. Салина, Т.Ю. Продукция интерферона- γ мононуклеарными клетками крови больных при разных типах течения туберкулезного процесса / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Проблемы туберкулеза. - 2004. - № 10. - С. 19-22.
126. Сафарян, М.Д. Прогнозирование риска развития лекарственной устойчивости возбудителя у больных легочным туберкулезом / М.Д. Сафарян // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2008. - № 9. - С. 40-43.
127. Сахарова, И.Я. Показатели иммунитета и биологические свойства микобактерий при инфильтративном туберкулезе легких / И.Я. Сахарова // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. - 2005. - № 11. - С. 14-18.
128. Сахно, Л.В. Антигенпрезентирующие клетки при туберкулезе легких / Л.В. Сахно, Е.Р. Черных // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2012. - № 1. - С. 3-9.
129. Семейный анализ ассоциации полиморфизма генов SLC11A1, VDR, IL12B, IL1B, IL1RA с туберкулезом у тувинцев и русских / М.Б. Фрейдин, Э.А. Ондар, А.А. Рудко и др. // Медицинская генетика. - 2006. - Т. 5, № 10. - С. 13-15.
130. Семенкова, Е.Н. Клинические аспекты гиперэозинофилии / Е.Н. Семенкова, С.В. Моисеев, О.Г. Наместникова // Клиническая медицина. - 2004. - №2. - С. 28-31.
131. Сенников, С.В. Аллельные варианты и изоформы цитокинов в диагностике и патогенезе иммунопатологических состояний / С.В. Сенников, А.Н. Силков, В.А. Козлов // Иммунология. - 2002. - №4. - С. 243-250.
132. Сенников, С.В. Роль альтернативного сплайсинга генов цитокинов в формировании полиморфной структуры цитокиновой сети / С.В. Сенников,

- А.Н. Силков, В.А. Козлов // Медицинская иммунология. - 2001. - Т. 3, № 3. - С. 389-396.
133. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-1: физиология, патология, клиника / А.С. Симбирцев. - М.: Фолиант, 2011. - 480 с.
134. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. - 1998. - № 6. - С. 3-8.
135. Симбирцев, А.С. Роль цитокинов в регуляции физиологических функций иммунной системы / А.С. Симбирцев // Физиология и патология иммунной системы. - 2004. - № 10. - С. 3-10.
136. Симбирцев, А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета / А.С. Симбирцев // Иммунология. - 2005. - № 6. - С. 368-377.
137. Симбирцев, А.С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных цитокинов / А.С. Симбирцев, А.Ю. Громова // Цитокины и воспаление. - 2005. - Т. 4, № 1. - С. 3-10.
138. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - Т. 3, № 2. - С. 16-21.
139. Синьков, В.В. Эпидемиология туберкулеза в России: молекулярные и исторические доказательства в пользу сценария распространения пекинского генотипа *M. tuberculosis* в XX веке / В.В. Синьков, Е.Д. Савилов, О.Б. Огарков // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2010. - № 1. - С. 57-62.
140. Смольникова, М.В. Клиническая иммуногенетика заболеваний человека / М.В. Смольникова, В.И. Коненков // Медицинская иммунология. - 2001. - Т. 3, № 3. - С. 379-389.
141. Старые и новые опухоли лимфатической системы / А.И. Воробьев, А.М., Кременецкая, Ю.Ю. Лорие и др. // Терапевтический архив. - 2000. - № 7. - С. 9-13.
142. Струков, А.И. Патологическая анатомия: учебник для студентов медицинских вузов / А.И. Струков, В.В. Серов. - М: Литтерра, 2010. - 848 с.
143. Структура делеций, выявленных в геномах клинических штаммов *Mycobacterium tuberculosis* / А.Г. Богун, В.А. Анисимова, В.Н. Степаншина, И.Г. Шемякин // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. - 2007. - № 12. - С. 42-46.

144. Субпопуляционная принадлежность Т-клеток, подверженных анергии и апоптозу у больных туберкулезом легких / Е.Р. Черных, А.А. Останин, В.С. Кожевников и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2002. - № 7. - С. 43-47.
145. 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. - 2011. - № 4. - С. 183-186.
146. Т-клеточная анергия в патогенезе иммунной недостаточности при туберкулезе легких / Л.В. Сахно, М.А. Тихонова, Е.В. Курганова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. - 2004. - № 11. - С. 23-28.
147. Трапезников, Н.Н. Справочник по онкологии / Н.Н. Трапезников, И.В. Поддубная, Т.И. Артамонов. - Каппа, 1996. - 624 с.
148. Туберкулез в Российской Федерации, 2010. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации. - М., 2011. - 280 с.
149. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль / под ред. Б.Р. Блума. М.: Медицина, 2002. - 696 с.
150. Тунгусова, О.С. Влияние лекарственной устойчивости на фитнес микобактерий туберкулеза генотипа W-Beijing / О.С. Тунгусова, А.О. Марьяндышев, Д.А. Каугант // Туберкулез и болезни легких. - 2005. - № 8. - С. 46-50.
151. Тунгусова, О.С. Молекулярные механизмы формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза / О.С. Тунгусова, А.О. Марьяндышев // Проблемы туберкулеза. - 2001. - № 6. - С. 48-49.
152. Филинюк, О.В. Функциональная активность фагоцитов при туберкулезе легких / О.В. Филинюк // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2006. - № 1. - С. 79-81.
153. Филинюк, О.В. Факторы риска, ассоциированные с множественно лекарственно-устойчивым туберкулезом: Дис. ... докт. мед. наук. / О.В. Филинюк. - Новосибирск, 2011. - 334 с.

154. Флейс, Дж. Статистические методы для изучения таблиц долей и пропорций / Дж. Флейс. - М.: Финансы и статистика, 1989. - 319 с.
155. Флеминг, М.В. О взаимовлиянии аллергических реакций и злокачественных процессов (современное состояние проблемы) / М.В. Флеминг, В.В. Климов, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. - 2005. - №1. - С. 96-101.
156. Фрейдлин, И.С. Клетки иммунной системы / И.С. Фрейдлин, А.А. Тотолян. - СПб.: Наука, 2001. - 390 с.
157. Фрейдлин, И.С. Ключевая позиция макрофагов в цитокиновой регуляторной сети / И.С. Фрейдлин // Иммунология. - 1995. - № 3. - С. 44-48.
158. Фрейдлин, И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции / И.С. Фрейдлин // Иммунология. - 2001. - № 5. - С. 4-7.
159. Фрейдлин, И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции / И.С. Фрейдлин // Медицинская иммунология. - 2005. - Т. 7, № 4. - С. 347-354.
160. Фрейдлин, И.С. Взаимосвязи врожденного и приобретенного иммунитета при инфекциях (ревизия классических догм) / И.С. Фрейдлин // Инфекция и иммунитет. - 2011. - Т.1, № 3. - С. 199 - 206.
161. Хаитов, Р.М. Иммунология: учебник / Р.М. Хаитов. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 320 с.
162. Хаитов, Р.М. Иммунология: атлас / Р.М. Хаитов, А.А. Ярилин, Б.В. Пинегин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 624 с.: ил.
163. Хаитов, Р.М. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете / Р.М. Хаитов, М.В. Пашенков, Б.В. Пинегин // Иммунология. - 2009. - №1. - С. 66-74.
164. Хаитов, Р.М. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, А.А. Ярилин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. - 352 с.: ил.
165. Хайдуков, С.В. Цитометрический анализ субпопуляций Т-хелперов (Th1, Th2, Treg, Th17, Т-хелперы активированные) / С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка // Медицинская иммунология. - 2011. - Т. 13, №1. - С. 7-16.

166. Хантаева, Н.С. Анализ и прогнозирование эпидемиологических показателей по туберкулезу на основе использования многомерных методов исследования / Н.С. Хантаева, И.М. Михалевич, Д.В. Кулеш // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2011. - № 2(78). - С. 184-189.
167. Характер специфического иммунного ответа и продукция цитокинов мононуклеарами больных разными формами туберкулеза легких / Б.Е. Кноринг, И.С. Фрейдлин, А.С. Симбирцев и др. // Мед. иммунол. - 2001. - Т. 3, № 1. - С. 61-68.
168. Хемокины и прогрессия злокачественных новообразований / Н.В. Чердынцева, П.А. Гервас, Н.В. Литвяков и др. // Медицинская иммунология. - 2006. - № 8(2-3). - С. 355.
169. Хоменко, А.Г. Современные представления о патогенезе туберкулеза / А.Г. Хоменко // РМЖ. - 1998. - Т. 6, № 17. - С. 23-29.
170. Хоменко, А.Г. Современные тенденции в эпидемиологии туберкулеза и пути уменьшения резервуара инфекции / А.Г. Хоменко // Проблемы туберкулеза. - 1997. - № 1. - С. 4-6.
171. Хрулева, Т.С. Резервуар туберкулезной инфекции / Т.С. Хрулева // Проблемы туберкулеза. - 2001. - № 6. - С. 11-14.
172. Цитокины при туберкулезе / В.Я. Гергерт, М.М. Авербах, Г.Г. Космиади и др. // Вестник РАМН. - 1995. - № 7. - С. 33-38.
173. Цитокиноопосредованные механизмы формирования синдрома эозинофилии при гемобластозах / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.Н. Кнутарева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Бюллетень СО РАМН. - 2007. - № 2 (124). - С. 139-143.
174. Цитотоксический потенциал эозинофильных гранулоцитов у больных с синдромом эозинофилии / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.Н. Кнутарева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. - № 3. - С. 26-30.
175. Чередеев, А.Н. CD-маркеры в практике клинико-диагностических лабораторий / А.Н. Чередеев, Н.К. Горлина, И.Г. Козлов // Клиническая лабораторная диагностика. - 1999. - № 6. - С. 25-32.

176. Черногорюк, Г.Э. Эозинофилия при хроническом описторхозе как фактор риска эрозивно-язвенной патологии желудка и воспалительных заболеваний бронхолегочной системы (Клинико-морфологические аспекты). Дис. ...д-ра мед. наук. - Томск, 2002. - 215 с.
177. Чурина, Е.Г. Роль регуляторных Т-клеток в иммунопатогенезе туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью: Дис. ... докт. мед. наук. / Е.Г. Чурина. – Томск, 2012. 299 с.
178. Чучалин, А.Г. Гиперэозинофилия при заболеваниях органов дыхания / А.Г. Чучалин // Терапевтический архив. - 2003. - №3. - С. 5-15.
179. Шевченко, А.В. Особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и TNFA европейского населения Западной Сибири / А.В. Шевченко, О.В. Голованова, В.И. Коненков. // Иммунология. - 2010. - Т. 1, № 4. - С. 176-181.
180. Шилова, М.В. Распространенность туберкулеза в Российской Федерации и в мире / М.В. Шилова // Медицинский алфавит. - 2012. - Т. 1, № 3. - С. 5-10.
181. Шиффман, Фр.Дж. Патопфизиология крови / Фр.Дж. Шиффман. - СПб.: БИНОМ, 2000. - 446 с.
182. Шкарин, А.В. Уровень цитокинов в плазме крови у больных активным инфильтративным туберкулезом легких / А.В. Шкарин, С.С. Белоусов, О.А. Аникина // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. - 2008. - № 8. - С. 34-38.
183. Шпаковская, Н.С. Связь локальной продукции цитокинов с особенностями течения туберкулеза легких / Н.С. Шпаковская, Л.К. Суркова, Е.М. Скрыгина // Медицинская иммунология. - 2007. - Т. 9, №2. - С. 254-255.
184. Эозинофильный гастроэнтерит / А.С. Логинов, А.И. Парфенов, И.Н. Ручкина, Н.И. Екисенина // Терапевтический архив. - 1998. - № 2. - С. 77-79.
185. Эпидемиология, течение и особенности лечения туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией / Медицина в Кузбассе. - 2011. - Т. 10, № 3. - С. 6-13.
186. Ярилин, А.А. Иммунология: учебник / А.А. Ярилин. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 752 с.
187. Ярилин, А.А. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор FOXP3 / А.А. Ярилин, А.Д. Донецкова // Иммунология. - 2006. - № 3. - С. 176-188.

188. Ячник, А.И. Механизмы реализации хронического воспаления при бронхиальной астме и возможные подходы к лечению / А.И. Ячник, Г.П. Победенная // Украинский пульмонологический журнал. - 2005. - № 1. - С. 60-63.
189. A critical role for vesicle-associated membrane protein-7 in exocytosis from human eosinophils and neutrophils / M.R. Logan, P. Lacy, S.O. Odemuyiwa et al. // J. Allergy. - 2006. - Vol. 61. - P. 777-784.
190. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL5R) is composed of an IL5-specific α chain and a β chain shared with the receptor for GM-CSF / J. Tavernier, R. Devos, S. Cornelis et al // J. Cell. - 1991. - Vol. 66(7). - P. 1175-1178.
191. A new isoform of interleukin-3 receptor alpha with novel differentiation activity and high affinity binding mode / J. Chen, J. Olsen, S. Ford et al. // J. Biol. Chem. - 2009. - Vol. 284(9). - P. 5763-5773.
192. Anti-IL-5 attenuates activation and surface density of β (2) -integrins on circulating eosinophils after segmental antigen challenge / M.W. Johansson, K.A. Gunderson, E.A. Kelly, L.C. Denlinger, N.N. Jarjour, D.F. Mosher // Clin. Exp. Allergy. - 2013. - Vol. 43(3). - P. 292-303.
193. A recently evolved sublineage of the M. tuberculosis Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease / M. Hanekom, G.D. van der Spuy, E. Streicher et al. // J. A Clin. Microbiol. - 2007. - Vol. 45. - P. 1483-1490.
194. A single nucleotide polymorphism in the CCR3 gene ablates receptor export to the plasma membrane / E.L. Wise, K.T. Bonner, T.J. Williams et al. // J. Allergy Clin. Immunol. - 2010. - Vol. 8(2). - P. 1-10.
195. Akuthota, P. Human Eosinophils Express Functional CCR7 / P. Akuthota, S. Ueki, J. Estanislau, P.F.Weller // Am J. Respir. Cell Mol. Biol. - 2013. - Vol. 28. - P. 123-130.
196. Aceves, S.S. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis / S.S. Aceves, R.O. Newbury, R. Dohil // J. Allergy Clin. Immunol. - 2007. - Vol. 119(1). - P. 206-212.

197. Ackerman S.J. Charcot-Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion / S.J. Ackerman, L. Liu, M.A. Kwatia // *J. Biol. Chem.* - 2002. - Vol. 277. - P. 14859-14868.
198. Activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils by arachidonic acid / V.V. Cherny, L.M. Henderson, W. Xu, L.L. Thomas, T.E. DeCoursey // *J. Physiol.* - 2001. - Vol. 535. - P. 783-794.
199. Acute helminth infection enhances early macrophage mediated control of mycobacterial infection / N. Plessis, L. Kleynhans, L. Thiart et al. // *J. Mucosal Immunol.* - 2012. - Vol. 36(8). - P. 1-12.
200. Airways eosinophils accumulate in the mediastinal lymph nodes but lack antigen-presenting potential for naive T-cells / L.S. van Rijt, N. Vos, D. Hijdra, V.C. De Vries, H.C. Hoogsteden, B.N. Lambrecht // *J. Immunol.* - 2003. - Vol. 171. - P. 3372-3378.
201. Airway epithelial cells produce neutrophins and promote the survival of eosinophils during allergic airway inflammation / C. Hahn, A.P. Islamian, H. Renz, A. Nockher // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2006. - Vol. 117. - P. 787-794.
202. Al-Abdulhadi, S.A. Linkage and haplotype analysis for chemokine receptors clustered on chromosome 3p21.3 and transmitted in family pedigrees with asthma and atopy / S.A. Al-Abdulhadi, M.W.O. Al-Rabia. // *J. Ann Saudi Med.* - 2010. - Vol. 30(2). - P. 115-122.
203. An investigation of polymorphisms in the 17q11.2-12 CC chemokine gene cluster for association with multiple sclerosis in Australians / M.J. Bugeja, D. Booth, B. Bennets et al. // *J. Medical Genetics.* - 2006. - Vol. 7(64). - P. 1-12.
204. Analysis of leukemia inhibitory factor, type 1 and type 2 cytokine production in patients with eosinophilic fasciitis / J.F. Viallard, J.L. Taupin, V. Ranchin et al. // *J. Rheumatol.* - 2001. - Vol. 28. - P. 75-80.
205. Analysis of mutations in the GM-CSF receptor alpha coding sequence in patients with acute myeloid leukemia and haema-tologically normal individuals by RT-PCR-SSCP / H.M. Wagner, R.E. Gale, R.W. Freeburn et al. // *J. Leukemia.* - 1994. - Vol. 8. - P. 1527-1532.

206. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes / E. Lianes, J. Quiralte, E. Lopez et al. // *J. Int. Arch Allergy Immunol.* - 2009. - Vol. 148(3). - P. 228-238.
207. Analysis of single nucleotide polymorphism in the promoter and protein expression of the chemokine Eotaxin-1 in colorectal cancer patients / D. Wagsater, S. Lofgren, A. Hugander et al. // *World Journal of Surgical Oncology.* - 2007. - Vol. 5(84). - P. 1-7.
208. Analysis of the 5q31-33 locus shows an association between single nucleotide polymorphism variants in gene and symptomatic IL-5 the infection with the human blood fluke *Schistosoma japonicum* / M.K. Ellis, Z.Z. Zhao, H-G. Chen et al. // *J. Immunol.* - 2007. - Vol. 179. - P. 8366-8371.
209. Andy, J.J. Helminth associated hypereosinophilia and tropical endomyocardial fibrosis (EMF) in Nigeria / J.J. Andy, P.O. Ogunowo, N.A. Akpan // *J. Acta Trop.* - 1998. - Vol. 69. - P. 127-140.
210. Association analysis of polymorphisms in IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 with Graves' disease / W. Zhu, N. Liu, Y. Zhao et al. // *J. Endocrinol Invest.* - 2010. - Vol. 33(10). - P. 751-755.
211. Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis / C. Ridruechai, S. Mahasirimongkol, J. Phromjai et al. // *J. Genes and Immunity.* - 2010. - Vol. 11. - P. 416-422.
212. Association of Eotaxin gene family with asthma and serum total IgE / H.D. Shin, L.H. Kim, B.L. Park et al. // *J. Human Molecular Genetics.* - 2003. - Vol. 12(11). - P. 1279-1285.
213. Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6 and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases / N. Inoue, M. Watanabe, M. Morita et al. // *J. Clinical & Experimental Immunology.* - 2011. - Vol. 163(3). - P. 318-323.
214. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection / S. Hellier, A.J. Frodsham, J.W. Hennig et al. // *J. Hepatology.* - 2009. - Vol. 38(6). - P. 1468-1476.

215. Associations of IL-2 and IL-4 gene polymorphisms in the Korean population / Y.K. Kim, C.W. Pyo, H.B. Choi et al. // *J. Dermatol. Sci.* - 2007. - Vol. 48(2). - P. 133-139.
216. Association of SNP in the IL-4, IL-18 and eotaxin genes with asthma in a Jordanian population / K.A. Attab, K.M. Al-Qaoud, K.Al-Bataieneh et al. // *Int. J. of Integrative Biology.* - 2008. - Vol. 4(2). - P. 86-91.
217. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection / A.R. De Jesus, A. Magalhaes, D.G. Miranda et al. // *J. Infect. Immun.* - 2004. - Vol. 72. - P. 3391-3397.
218. Asthma exacerbations and sputum eosinophil counts: a randomised controlled trial / R.H. Green, C.E. Brightling, S. McKenna et al. // *J. Lancet.* - 2002. - Vol. 360. - P. 1715-1721.
219. Beissert, S. Regulatory T cells / S. Beissert, A. Schwarz, T. Schwarz // *J. Invest. Dermat.* - 2006. - Vol. 126. - P. 15-24.
220. Biomarkers of eosinophil involvement in allergic and eosinophilic diseases: review of phenotypic and serum markers including a novel assay to quantify levels of soluble Siglec-8 / H.J. Na, R.G. Hamilton, A.D. Klion, B.S. Bochner // *J. Immunol. Methods.* - 2012. - Vol. 383. - P. 39-46.
221. Blanchard, C. Biology of the eosinophil / C. Blanchard, M.E. Rothenberg // *J. Adv. Immunol.* - 2009. - Vol. 101. - P. 81-121.
222. Blockade of IL-10 Signaling during *Bacillus Calmette-Guerin* Vaccination Enhances and Sustains Th1, Th17, and Innate Lymphoid IFN- γ and IL-17 Responses and Increases Protection to *Mycobacterium tuberculosis* Infection / J.M. Pitt, E. Stavropoulos, P.S. Redford, A.M. Beebe, G.J. Bancroft, D.B. Young, A. O'Garra // *J. Immunol.* - 2012. - Vol. 189(8). - P. 4079-4087.
223. Bonneville, M. Selection of intraepithelial $\gamma\delta$ T cells: the holy GrIEL at last / M. Bonneville // *J. Nature Immunol.* - 2006. - Vol. 7. - P. 791-792.
224. Bonneville, M. Sensing cell stress and transformation through V γ 9V δ 2⁺T-cell mediated recognition of the isoprenoid pathway metabolites / M. Bonneville, J. Fournie // *J. Microbes Infection.* - 2005. - Vol. 7. - P. 503-509.

225. Boom, W.H. Human Mycobacterium tuberculosis-reactive CD4⁺ T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes / W.H. Boom, R.S. Wallis, K.A. Chervenak // *J. Infect. Immun.* - 1991. - Vol. 89. - P. 2737-2743.
226. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood / A. Boyum // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* - 1968. - Vol. 21(97). - P. 77.
227. Bromination of deoxycytidine by eosinophil peroxidase: a mechanism for mutagenesis by oxidative damage of nucleotide precursors / J.P. Henderson, J. Byun, M.V. Williams et al. // *J. Proc Natl. Acad. Sci. USA.* - 2001. - Vol. 98. - P. 1631-1636.
228. CD11c⁺-eosinophils in the murine thymus: developmental regulation and recruitment upon MHC class I-restricted thymocyte deletion / M. Throsby, A. Herbelin, J.M. Pleau, M. Dardenne // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 165. - P. 1965-1975.
229. CD25⁺ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection / D.C. Lee, J.A. Harker, J.S. Tregoning et al. // *J. Virol.* - 2010. - Vol. 84(17). - P. 8790-8798.
230. CXCL9 inhibits eosinophil responses by a CCR3- and Rac2-dependent mechanism / P.C. Fulkerson, H. Zhu, D.A. Williams, N. Zimmermann, M.E. Rothenberg // *J. Blood.* - 2005. - Vol. 106. - P. 436-443.
231. Campos, L.E.M. Pulmonary eosinophilia / L.E.M. Campos, L.F.F. Pereira. // *J. bras. pneumol.* - 2009. - Vol. 35(6). - P. 125-132.
232. Castro, A.G. Live but Not Heat-Killed Mycobacteria Cause Rapid Chemotaxis of Large Numbers of Eosinophils In Vivo and Are Ingested by the Attracted Granulocytes / A.G. Castro, N. Esaguy, P. Macedo et al. // *J. Infect. and immun.* - 1991. - Vol. 59(9). - P. 3009- 3014.
233. Catalog of 300 SNPs in 23 genes encoding G-protein coupled receptors / A. Lida, S. Saito, A. Sekine et al. // *J. Hum Genet.* - 2004. - P. 194-208.
234. Chemokines in eosinophil-associated gastrointestinal disorders / S.P. Hogan, M.E. Rothenberg, E. Forbes, V.E. Smart, K.I. Matthaei, P.S. Foster // *J. Curr Allergy Asthma Rep.* - 2004. - Vol. 4. - P. 74-82.

235. Chen, W. Conversion of peripheral CD4⁺ CD25⁺ naive T cells to CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells by TGFB induction of transcription factor Foxp3 / W. Chen, W. Jin, N. Hardegen // *J. Exp. Med.* - 2003. - Vol.198. - P. 1875-1886.
236. Complete remission of a primary cutaneous B-cell lymphoma of the lower leg by first-line monotherapy with the anti-CD20-antibody rituximab / B. Bonnekoh, M. Schulz, I. Franke et al. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* - 2002. - Vol. 128. - P. 161-166.
237. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution / R.B. Sutton, D. Fasshauer, R. Jahn, A.T. Brunger // *J. Nature.* - 1998. - Vol. 395. - P. 347-353.
238. Cytokine polymorphisms in Th1/Th2 pathway genes, body mass index, and risk of non-Hodgkin lymphoma / Y. Chen, T. Zheng, Q. Lan et al. // *J. Blood.* - 2011. - Vol. 117(2). - P. 585-590.
239. Cytokine profile in the liver of primary biliary cirrhosis / T. Nagano, K. Yamamoto, S. Matsumoto et al. // *J. Clin. Immunol.* - 1999. - Vol. 19. - P. 422-427.
240. Cystic fibrosis / S.M. Rowe, S. Miller, E.J. Sorscher et al. // *N. Engl. J. Med.* - 2005. - Vol. 325. - P. 1992-2001.
241. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines / A. Hartnell, D.S. Robinson, A.B. Kay, A.J. Wardlaw // *J. Immunol.* - 1993. - Vol. 80(4). - P. 281-286.
242. CD98 positive eosinophils contribute to T helper 1 pattern inflammation / F.M. Xue, H.P. Zhang, H.J. Hao, Z.Y. Shi, C. Zhou, B. Feng, P.C. Yang // *J. PLoS One.* - 2012. - Vol. 7(12). - P. 112-119.
243. Clarification of the role of N-glycans on the common beta-subunit of the human IL-3, IL-5 and GM-CSF receptors and the murine IL-3 beta-receptor in ligand-binding and receptor activation / J.M. Murphy, T.A. Soboleva, S. Mirza et al. // *J. Cytokine.* - 2008. - Vol. 42(2). - P. 234-242.
244. Chemokine receptor usage by human eosinophils / H. Heath, S. Qin, P. Rao et al. // *J. Clin. Invest.* - 1997. - Vol. 99(9). - P. 178-184.
245. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13 / N. Zimmermann, G.K. Hershey, P.S. Foster, M.E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2003. - Vol.111. - P. 227-242.

246. Cloning, expression and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor / B.L. Daugherty, S.J. Siciliano, J. DeMartino et al. // *J. Exp. Med.* - 1996. - Vol. 183(6). - P. 2349-2354.
247. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils / P.D. Ponath, S. Qin, D.J. Ringler et al. // *J. Clin. Invest.* - 1996. - Vol. 97(2). - P. 604-612.
248. Conroy, D.M. Eotaxin and the attraction of eosinophils to the asthmatic lung / D.M. Conroy, T.J. Williams. // *J. Respir. Res.* - 2001. - Vol. 2. - P. 150-156.
249. Contribution of Eotaxin-1 to Eosinophil Chemotactic Activity of Moderate and Severe Asthmatic Sputum / G. Dent, C. Hadjicharalambous, T. Yoshikawa et al. // *Am. J. of Resp. and Critic. Care Med.* - 2004. - Vol. 169. - P. 1110-1117.
250. CR3-dependent negative regulation of human eosinophils by *Mycobacterium bovis* BCG lipoarabinomannan / V. Driss, E. Hermann, F. Legrand, S. Loiseau, L. Kremer, Y. Guerardel, D. Dombrowicz // *J. Immunol. Lett.* - 2012. - Vol. 143(2). - P. 202-207.
251. Curran, C.S. Lactoferrin regulates an axis involving CD11b and CD49d integrins and the chemokines MIP-1 α and MCP-1 in GM-CSF-treated human primary eosinophils / C.S. Curran, P.J. Bertics // *J. Interferon Cytokine Res.* - 2012. - Vol. 32(10). - P. 450-461.
252. Cytokine expression in T-cell lymphomas and Hodgkin's disease. Its possible implication in autocrine or paracrine production as a potential basis for neoplastic growth / H. Merz, A. Fliedner, K. Orscheschek et al. // *Am. J. Pathol.* - 1991. - Vol. 139(5). - P. 1173-1180.
253. De Brosse, C.W. Allergy and eosinophil-associated gastrointestinal disorders (EGID) / C.W. De Brosse, M.E. Rothenberg // *J. Current Opinion in Immunol.* - 2008. - Vol. 20. - P. 703-708.
254. Defective B-1 cell development and impaired immunity against *Angiostrongylus cantonensis* in IL-5Ra-deficient mice / T. Yoshida, K. Ikuta, H. Sugaya et al. // *J. Immnity.* - 1996. - Vol. 4. - P. 483-494.
255. Dellon, E.S. Eosinophilic esophagitis / E.S Dellon // *Gastroenterol. Clin. North Am.* - 2013. - Vol. 42(1). - P. 133-153.

256. Dias, P.M. The Role of Th17/IL-17 on Eosinophilic Inflammation / P.M. Dias, G. Banerjee // *J. of Autoimmun.* - 2013. - Vol. 40. - P. 9-20.
257. Discovery of a fusion kinase in EOL-1 cells and idiopathic hypereosinophilic syndrome / J.H. Griffin, J. Leung, R.J. Bruner, M.A. Caligiuri, R. Briesewitz // *J. Proc Natl. Acad. Sci. USA.* - 2003. - Vol. 100. - P. 7830-7835.
258. Dissection of the hyperadhesive phenotype of airway eosinophils in asthma / S.R. Barthel, N.N. Jarjour, D.F. Mosher, M.W. Johnansson // *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 2006. - Vol. 35. - P. 378-386.
259. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells / S.J. Bensing, P.T. Walsh, J. Zhang et al. // *J. Immunol.* - 2004. - Vol. 172(9). - P. 5287-5296.
260. Distribution of sputum cellular phenotype in a large asthma cohort: predicting factors for eosinophilic vs neutrophilic inflammation / F.N. Schleich, M. Manise, J. Sele, M. Henket, L. Seidel, R. Louis // *BMC Pulm. Med.* - 2013. - Vol. 13(1). - P. 11-14.
261. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects / P. Lacy, D. Abdel Latif, M. Steward, S. Musat-Marcu, S.F. Man, R. Moqbel // *J. Immunol.* - 2003. - Vol. 170. - P. 2670-2679.
262. Dolgachev, V. Eosinophil Activation of fibroblasts from chronic allergen-induced disease utilizes stem cell factor / V. Dolgachev, A.A. Berlin, N.W. Lukacs // *The Am. J. of Pathol.* - 2008. - Vol. 172(1). - P. 68-76.
263. Dvorak, A.M. Ultrastructural analysis of human eosinophils / A.M. Dvorak, P.F. Weller // *J. Chem. Immunol.* - 2000. - Vol. 76(5). - P. 1-28.
264. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response / M.J. Leckie, A. Brinke, J. Khan et al. // *J. Lancet.* - 2000. - Vol. 356. - P. 2144-2148.
265. Effect of SCH55700, a humanized anti-human interleukin-5 antibody, in severe persistent asthma: a pilot study / J.C. Kips, B.J. O'Connor, S.J. Langley et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2003. - Vol. 167. - P. 1655-1659.

266. Effect of Tong Qiao drops on the expression of eotaxin, IL-13 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis / Y.Y. Xu, X. Liu, L.B. Dai et al. // *J. Chin. Med. Assoc.* - 2012. - Vol. 75(10) - P. 524-529.
267. Elsas, P.X. Eosinophil cytotoxicity enhancing factor: purification, characterization and immunocytochemical localization on the monocyte / P.X. Elsas, M.I. Elsas, A.J. Dessein // *Eur. J. Immunol.* - 1990. - Vol. 20(5). - P. 1143-1151.
268. Eltboli, O. Eosinophils as diagnostic tools in chronic lung disease / O. Eltboli, C.E. Brightling // *Expert Rev. Respir. Med.* - 2013. - Vol. 7. - P. 33-42.
269. Enterocyte expression of the eotaxin and interleukin-5 transgenes induces compartmentalized dysregulation of eosinophil trafficking / A. Mishra, S.P. Hogan, E.B. Brandt et al. // *J. Biol. Chem.* - 2002. - Vol. 277. - P. 4406-4412.
270. Eosinophil associated genes in the inflammatory bowel disease 4 region: Correlation to inflammatory bowel disease revealed / K. Blom, J. Rubin, J. Halfvarson et al. // *World J. Gastroenterol.* - 2012. - Vol. 18 (44). - P. 6409-6419.
271. Eosinophils in fungus-associated allergic pulmonary disease / S. Ghosh, S.A. Hoselton, G.P. Dorsam, J.M. Schuh // *Front Pharmacol.* - 2013. - Vol. 4. - P. 8-16.
272. Eosinophilia during fludarabine treatment of chronic lymphocytic leukaemia / O. Sezer, P. Schmid, M. Hallek et al. // *J. Ann. Hematol.* - 1999. - Vol. 78(6). - P. 475-477.
273. Eosinophilia in primary biliary cirrhosis / K. Yamazaki, I. Nakadate, K. Suzuki et al. // *Am. J. Gastroenterol.* - 1996. - Vol. 91. - P. 516-522.
274. Eosinophils: a putative marker of immunodepression in HIV-infected African patients with tuberculosis? / E. Ledru, S. Diagbouga, J. Tranchot-Diallo, B. Cauchoix, M. Yameogo, D. Chami, G. Soula, J.P. Chiron // *J. Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* - 1994. - Vol. 88(1). - P. 117-118.
275. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein / G.T. Furuta, E.E. Nieuwenhuis, J. Karhausen et al. // *Am. J. Physiol.* - 2005. - Vol. 289. - P. 890-897.
276. Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation / A.B. Kay, L. Barata, Q. Meng et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* - 1997. - Vol. 113(3). - P. 196-199.

277. Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cells / Z.T. Handzel, W.W. Busse, J.B. Sedgwick et al. // *J. Immunol.* - 1998. - Vol. 160. - P. 1279-1284.
278. Eosinophil-tumor cell interaction in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic approach / R.A. Caruso, A. Bersiga, L. Rigoli et al. // *Anticancer Res.* - 2004. - Vol. 22(6). - P. 3833-3836.
279. Eomesodermin controls interleukin-5 production in memory T helper 2 cells through inhibition of activity of the transcription factor GATA3 / Y. Endo, C. Iwamura, M. Kuwahara et al. // *Immunity.* - 2011. - Vol. 35(5). - P. 733-745.
280. Eotaxins and CCR3 interaction regulates the Th2 environment of cutaneous T-cell lymphoma / T. Miyagaki, M. Sugaya, H. Fujita et al. // *J. Invest. Dermatol.* - 2010. - Vol. 130(9). - P. 2304-2311.
281. Eotaxin/CCL11 in idiopathic retroperitoneal fibrosis / D. Manqieri, D. Corradi, D. Martorana et al. // *J. Nephrol. Dial. Transplant.* - 2012. - Vol. 27(10). - P. 3875-3884.
282. Eotaxin gene single nucleotide polymorphisms in the promoter and exon regions are not associated with susceptibility to atopic dermatitis, but two of them in the promoter region are associated with serum IgE levels in patients with atopic dermatitis / Y. Tsunemi, H. Saeki, K. Nakamura et al. // *J. of Dermatol. Sci.* - 2002. Vol. 1. - P. 222-228.
283. Eotaxin is required for the baseline level of tissue eosinophils / A.N. Matthews, F.S. Daniel, N. Zimmermann et al. // *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1998. - Vol. 95(11). - P. 6273-6278.
284. Essential and Instructive Roles of GATA Factors in Eosinophil Development / R. Hirasawa, R. Shimizu, S. Takahashi et al. // *J. Exp. Med.* - 2002. -Vol. 195(11). - P. 1379-1386.
285. Expression of CD28 and CD86 by human eosinophils and role in the secretion of type 1 cytokines (interleukin 2 and interferon gamma): inhibition by immunoglobulin A complexes / G. Woerly, N. Roger, S. Loiseau, D. Dombrowicz, A. Capron, M. Capron // *J. Exp. Med.* - 1999. - Vol. 190. - P. 487-495.
286. Expression of eosinophil target SNAREs as potential cognate receptors for vesicle-associated membrane protein-2 in exocytosis / M.R. Logan, P. Lacy, B. Bablitz, R. Moqbel // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2002. - Vol. 109. - P. 299-306.

287. Expression of membrane type-4 matrix metalloproteinase (metalloproteinase-17) by human eosinophils / M.C. Gauthier, C. Racine, C. Ferland et al. // *Int J. Biochem Cell Biol.* - 2003. - Vol. 35. - P. 1667-1673.
288. Expression of Th1 and Th2 Immunoregulatory Cytokines by Human Eosinophils / G. Woerly, N. Roger, S. Loiseau, M. Capron // *J. Int. Arch. Allergy Immunol.* - 1999. - Vol. - 118(2-4). - P. 95- 97.
289. Familial Eosinophilia maps to the cytokine gene cluster on human chromosomal region 5q31-q33 / J.D. Rioux, V.A. Stone, M.J. Daly et al. // *Am. J. Hum. Genet.* - 1998. - Vol. 63. - P. 1086-1094.
290. Fas-positive T cells regulate the resolution of airway inflammation in murine model of asthma / J. Tong, H.S. Bandulwaia, B.S. Clay et al. // *J. Exp. Med.* - 2006. - Vol. 203. - P. 1173-1184.
291. Feng, Y.H. Specific regulator of eosinophil apoptosis: Siglec-8-new hope for bronchial asthma treatment / Y.H. Feng, H. Mao // *Chin. Med. J. (Engl).* - 2012. - 125(11). - P. 2048 -2052.
292. Fulkerson, P.C. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling / P.C. Fulkerson, C.A. Fischetti, M.E. Rothenberg // *Am. J. Pathol.* - 2006. - Vol. 169(6). - P. 2117-2126.
293. Fulkerson P.C. Targeting eosinophils in allergy, inflammation and beyond / P.C. Fulkerson, M.E. Rothenberg // *Nat. Rev. Drug Discov.* - 2013. - Vol. 12(2). - P. 117 - 129.
294. Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand / F.A. Symon, M.B. Lawrence, M.L. Williamson, G.M. Walsh, S.R. Watson, A.J. Wardlaw // *J. Immunol.* - 1996. - Vol. 157. - P. 1711-1719.
295. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract / A. Mishra, S.P. Hogan, J.J. Lee, P.S. Foster, M.E. Rothenberg // *J. Clin. Invest.* - 1999. - Vol. 103. - P. 1719-1727.
296. Fusion protein vesicle-associated membrane protein 2 is implicated in IFN γ -induced piecemeal degranulation in human eosinophils from atopic individuals / P. Lacy, M.R. Logan, B. Bablitz, R. Moqbel // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2001. - Vol. 107. - P. 671-678.

297. Gao, G.F. Molecular coordination of $\alpha\beta$ T-cell receptors and coreceptors CD8 and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands / G.F. Gao, Z. Rao, J.I. Bell // *J. Trends Immunol.* - 2002. - Vol. 23. - P. 408-413.
298. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors / J. Zhu, H. Yamane, J. Cote-Sierra et al. // *J. Cell Res.* - 2006. - Vol. 16. - P. 3-10.
299. Gartner, I. Separation of human eosinophils in density gradients of polyvinylpyrrolidone-coated silica gel (Percoll) / I. Gartner // *J. Immunol.* - 1980. - Vol. 40. - P. 133-136.
300. Genetic polymorphisms of CC chemokine receptor 3 in Japanese and British asthmatics / K. Fukunaga, K. Asano, X-Q. Mao et al. // *Eur. Respir. J.* - 2001. - Vol. 17. - P. 59-63.
301. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy / S. Hoffjan, I. Ostrovnaja, D. Nicolae et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2004. - Vol. 113(3). - P. 511-518.
302. Genetic variants in T helper cell type 1, 2 and 3 pathways and gastric cancer risk in a Polish population / R. Mahajan, E.M. El-Omar, J. Lissowska et al. // *Jpn. J. Clin. Oncol.* - 2008. - Vol. 38(9). - P. 626-633.
303. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes / C. Keller, R. Hoffmann, R. Lang et al. // *J. Infect. and Immun.* - 2006. - Vol. 74(7). - P. 4295-4309.
304. Giembycz, M.A. Pharmacology of the eosinophil / M.A. Giembycz, M.A. Lindsay // *J. Pharmacol Rev.* - 1999. - Vol. 51. - P. 213-340.
305. Gleich, G.J. The eosinophilic leukocyte: structure and function / G.J. Gleich, C.R. Adolphson // *J. Adv. Immunol.* - 1986. - Vol. 39. - P. 177-253.
306. Gleich, G.J. The hypereosinophilic syndromes: still more heterogeneity / G.J. Gleich, K.M. Leiferman // *J. Curr. Opin. Immunol.* - 2005. - Vol. 17(6). - P. 379-384.
307. Glycerol monomycolate, a latent tuberculosis-associated mycobacterial lipid, induces eosinophilic hypersensitivity responses in guinea pigs / Y. Hattori, I. Matsunaga, T. Komori, T. Urakawa, T. Nakamura, N. Fujiwara, K. Hiromatsu K, H.

- Harashima, M. Sugita // *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2011. - Vol. 409(2). - P. 304-307.
308. GM-CSF, IL-3 and IL-5: Crosscompetition on human hemopoietic cells / A.F. Lopez, M.J. Elliot, I. Woodcock et al. // *J. Immunol. Today.* - 1992. - Vol. 13(7). - P. 495-500.
309. Gonzalo, J.A. Eosinophil recruitment to the lung in a murine model of allergic inflammation The role of T cells, chemokines, and adhesion receptors / J.A. Gonzalo, C.M. Lloyd, L. Kremer // *J. Clin. Invest.* - 1996. - Vol. 98. - P. 2332-2345.
310. Gouon-Evans, V. Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus / V. Gouon-Evans, J.W. Pollard // *J. Endocrinol.* - 2001. - Vol. 142. - P. 4515-4521.
311. Guajardo, J.R. Eosinophil-associated gastrointestinal disorders: a world-wide-web based registry / J.R. Guajardo, L.M. Plotnick, J.M. Fende // *J. Pediatr.* - 2002. - Vol. 141. - P. 576-581.
312. Guasch, J.F. Five novel intragenic dimorphisms in the human interleukin-1 genes combine to high informativity / J.F. Guasch, R.M. Bertina, P.H. Reitsma // *J. Cytok.* - 1996. - Vol. 8. - P. 598-602.
313. Haley, K.J. Ontogeny of the eotaxins in human lung / K.J. Haley, M.E. Sunday, Y. Porrata et al. // *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* - 2008. - Vol. 294. - P. 214-224.
314. Hamelmann, E. IL-5-induced airway eosinophilia the key to asthma? / E. Hamelmann, E.W. Gelfand // *J. Immunol. Rev.* - 2001. - Vol. 179. - P. 182-191.
315. Hauber, H.P. IL-9 in allergic inflammation / H.P. Hauber, C. Bergeron, Q. Hamid // *J. Int. Arch. Allergy Immunol.* - 2004. - Vol. 134. - P. 79-87.
316. Hayday, A.C. $\gamma\delta$ T-cells: A right time and right place for a conserved third way of protection / A.C. Hayday // *J. Ann. Rev. Immunol.* - 2000. - V.18. - P.975-1026.
317. Hayday, A.C. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells / A.C. Hayday, R. Tigelaar // *J. Nat. Rev.* - 2003. - Vol. 3. - P. 233-242.
318. Heldin, C.H. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor / C.H. Heldin, B. Westermark // *J. Physiol. Rev.* - 1999. - Vol. 79. - P. 1283-1316.

319. Herbein, H. Tumor necrosis factor and TNF receptors and viral pathogenesis / H. Herbein, W.A. Brien // *J. P. S. E. B. M.* - 2000. - Vol. 223. - P. 241-257.
320. Heterogeneity of interleukin 5 genetic background in atopic dermatitis patients: significant difference between those with blood eosinophilia and normal eosinophil levels / N. Yamamoto, H. Sugiura, K. Tanaka et al. // *J. Dermatol Sci.* - 2003. - Vol. 33. - P. 121-126.
321. High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils: role in activation by eotaxin, MCP-4 and other chemokines / M. Ugucioni, C.R. Mackay, P. Ochensberger et al. // *J. Clin. Invest.* - 1997. - Vol. 100(5). - P. 1137-1143.
322. Hogan, S.P. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease / S.P. Hogan, H.F. Rosenberg, R. Moqbel // *J. Clinic. & Exper.l Allergy.* - 2008. - Vol. 38. - P. 709-750.
323. Hogan, S.P. Interleukin-5 and eosinophils induce airway damage and bronchial hyperreactivity during allergic airway inflammation in BALB/c mice / S.P. Hogan, A. Koskinen, P.S. Foster // *J. Immunol. Cell Biol.* - 1997. - Vol. 75. - P. 284-288.
324. Howard, J. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines / J. Howard, S. Zwilling // *J. Clinical & Experimental Immunology.* - 1999. - Vol. 115(3). - P. 428-435.
325. Howard, A.D. Cytokine production by CD4 and CD8 T cells during the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice / A.D. Howard, B.S. Zwilling // *Clinical & Experimental Immunology.* - 1998. - Vol. 113 (3). - P. 443-449.
326. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially / L.A. Spencer, C.T. Szela, S.A. Perez, C.L. Kirchhoffer, J.S. Neves, A.L. Radke, P.F. Weller // *J. Leukoc. Biol.* - 2009. - Vol. 85. - P. 117-123.
327. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments / R.C. Melo, L.A. Spencer, S.A. Perez et al. // *J. Traffic.* - 2005. - Vol. 6. - P. 1047-1057.
328. Human eosinophils release IL-1 β and increase expression of IL-17A in activated CD4⁺ T lymphocytes / S. Esnault, E.A. Kelly, L.M. Nettenstrom, E.B. Cook, C.M. Seroogy, N.N. Jarjour // *Clin. Exp. Allergy.* - 2012. - Vol. 42(12). - P. 1756-1764.

329. ICAM-1-dependent pathways regulate colonic eosinophilic inflammation / E. Forbes, M. Hulett, R. Ahrens et al. // *J. Leukoc. Biol.* - 2006. - Vol. 80. - P. 330-341.
330. Identification of four new translocations involving FGFR1 in myeloid disorders / J. Sohal, A. Chase, S. Mould et al. // *J. Gen. Chrom. Canc.* - 2001 - Vol. 32. - P. 155-163.
331. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils / F. Levi-Schaffer, J. Barkans, T.M. Newman, S. Ying // *J. Immunol.* - 1996. - Vol. 87(1). - P. 155-161.
332. Identification of JAK2 as a mediator of FIP1L1-PDGFR α -induced eosinophil growth and function in CEL / B. Li, G. Zhang, C. Li, D. He, X. Li, C. Zhang, F. Tang, X. Deng // *J. PLoS One.* - 2012. - Vol. 7(4). - P. 34912.
333. Incomplete activation of human eosinophils via the histamine H₄-receptor: evidence for ligand-specific receptor conformations / T.M. Reher, D. Neumann, A. Buschauer, R. Seifert // *J. Biochem. Pharmacol.* - 2012. - Vol. 84(2). - P. 192-203.
334. Increased expression of collagen receptors: α 1b1 and α 2b1 integrins on blood eosinophils in bronchial asthma / S. Bazan-Socha, A. Bukiej, G. Pulka et al. // *J. Clin. Exp. Allergy.* - 2006. - Vol. 36. -P. 1184-1191.
335. Increased responsiveness of murine eosinophils to MIP-1 β (CCL4) and TCA-3 (CCL1) is mediated by their specific receptors, CCR5 and CCR8 / S.H. Oliveira, S. Lira, A.C. Martinez, M. Wiekowski, L. Sullivan, N.W. Lukacs // *J. Leukoc. Biol.* - 2002. - Vol. 71. - P. 1019-1025.
336. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis / F. Granucci, C. Vizzardelli, N. Pavelka et al. // *J. Nat. Immunol.* - 2001. - Vol. 2(9). - P. 882-888.
337. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN- γ and primed lymphocytes. / M. Boncini-Almeida, S. Chitale, I. Boutsikakis et al. // *J. Immunol.* - 1998. - Vol. 160. - P. 4490-4499.
338. Inflammation-related gene polymorphisms and colorectal adenoma / M.J. Gunter, F. Canzian, S. Landi et al. // *J. Cancer Epid. Biomar. Prev.* - 2006. - Vol. 15. - P. 1126-1131.

339. Interferon- γ and Interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis / D. Lopez-Maderuelo, F. Arnalich, R. Serantes et al. // *Am. J. of Resp. and critical care med.* - 2003. - Vol. 167. - P. 970-975.
340. Interplay of Adaptive Th2 Immunity with Eotaxin-3/C-C Chemokine Receptor 3 in Eosinophilic Esophagitis / J.Z. Bullock, J.M. Villanueva, C. Blanchard et al. // *J. of Ped. Gastroenterol. and Nut.* - 2007. - Vol. 45. - P. 22-31.
341. IL-3 and TNF α increase Thymic Stromal Lymphopoietin Receptor (TSLPR) expression on eosinophils and enhance TSLP-stimulated degranulation / E.B. Cook, J.L. Stahl, E.A. Schwantes et al. // *J. Clin. Mol. Allergy.* - 2012. - Vol. 10. - P. 1-9.
342. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity / R.M. Reiman, R.W. Thompson, C.G. Feng et al. // *J. Infect. Immun.* - 2006. - Vol. 74. - P. 1471-1479.
343. Interleukin-5 deficiency abolishes eosinophilia, airway hyperreactivity and lung damage in mouse asthma model / P. Foster, S. Hogan, A. Ramsay, K. Matthaei, I. Young // *J. Exp. Med.* - 1996. - Vol. 183. - P. 195-201.
344. Interleukin-5 expression in the lung epithelium of transgenic mice leads to pulmonary changes pathognomonic of asthma / J. Lee, M. McGarry, S. Farmer et al. // *J. Exp. Med.* - 1997. - Vol. 185. - P. 2143-2156.
345. Interleukin-5 Receptor Subunit oligomerization and rearrangement revealed by fluorescence resonance energy transfer imaging / M. Zaks-Ziberman, A.E. Harrington, T. Ishino et al. // *J. Biol. Chem.* - 2008. - Vol. 283(19). - P. 13398-13406.
346. IL-5 and thromboxane A2 receptor gene polymorphisms are associated with decreased pulmonary function in Korean children with atopic asthma / S.-J. Hong, S.-Y. Lee, H.-B. Kim et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2005. - Vol. 115. - P. 758-763.
347. Interleukin (IL)-12 receptor beta 1 codon 378 G homozygote and allele, but not IL-1 (beta-511 promoter, 3953 exon 5, receptor antagonist), IL-2 114, IL-4-590 intron 3, IL-8 3'-UTR 2767, and IL-18 105, are associated with higher susceptibility to leiomyoma / Y.Y. Hsieh, C.C. Chang, C.H. Tsai et al. // *J. Fertil. Steril.* - 2007. - Vol. 87(4). - P. 886-895.

348. Interleukin (IL)-13 gene polymorphisms are associated with rhinosinusitis and eosinophilic inflammation in aspirin intolerant asthma / N.S. Palikhe, S.-H. Kim, B.-Y. Cho et al. // *J. Allergy Asthma Immunol. Res.* - 2010. - Vol. 2(2). - P.134-140.
349. Incorporation of *M. tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block / A. Welin, M.E. Winberg, H. Abdalla et al. // *J. Infect. Immun.* - 2008. - Vol. 76. - P. 2882-2887.
350. Ionescu, M.A. In situ eosinophil activation in 26 primary cutaneous T-cell lymphomas with blood eosinophilia / M.A. Ionescu, J. Rivet, M. Daneshpouy // *J. Am Acad. Dermatol.* - 2005. - Vol. 52. - P. 32-39.
351. Ishino, T. Slow-dissociation effect of common signaling subunit beta c on IL5 and GM-CSF receptor assembly / T. Ishino, A.E. Harrington, M. Zaks-Zilberman // *J. Cytokine.* - 2008. - Vol. 42(2). - P. 179-190.
352. Johnson, V.J. Genotyping of single nucleotide polymorphisms in cytokine genes using real-time PCR allelic discrimination technology / V.J. Johnson, B. Yucesoy, M.I. Luster. // *J. Cytokine.* - 2004. - Vol. 27(6). - P. 135-141.
353. Johnson, T.R. Pulmonary eosinophilia requires interleukin-5, eotaxin-1 and CD4+ T cells in mice immunized with respiratory syncytiavirus G glycoprotein / T.R. Johnson, M.E. Rothenberg, B.S. Graham. // *J. Leukoc. Biol.* - 2008. - Vol. 84. - P. 748-759.
354. Josiane, S. Weller Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology / S. Josiane, F. Peter // *J. Curr. Opin. Immunol.* - 2009. - Vol. 21(6). - P. 694-699.
355. Kang, P.B. The human macrophage mannose receptor directs *M. tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis / P.B. Kang, A.K. Azad, J.B. Torrelles // *J. Exp. Med.* - 2005. - Vol. 202. - P. 987-999.
356. Kay, A.B. A role for eosinophils in airway remodelling in asthma / A.B. Kay, S. Phipps, D.S. Robinson // *J. Trends Immunol.* - 2004. - Vol. 25. - P. 477-482.
357. Khan, S. Eosinophilic gastroenteritis: epidemiology, diagnosis and management / S. Khan, S.R. Orenstein // *J. Paediatr. Drugs.* - 2002. - Vol. 4. - P. 563-570.
358. Kintzel, P.E. Recombinant interleukin-2: a biological response modifier / P.E. Kintzel, K.A. Calis // *J. Clin. Pharm.* - 1991. - Vol.10. - P.110-128.

359. Kim, J.T. Ligation of Fc gamma RII (CD32) pivotally regulates survival of human eosinophils / J.T. Kim, A.W. Schimming, H. Kita // *J. Immunol.* - 1999. - Vol. 162. - P. 4253-4259.
360. Kirman, J. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice / J. Kirman, Z. Zakaria, K. McCoy // *J. Infect. Immun.* - 2009. - Vol. 68(5). - P. 2976-2978.
361. Klion, A.D. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites / A.D. Klion, T.B. Nutman // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2004. - Vol. 113. - P. 30-37.
362. Korenaga, M. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice / M. Korenaga, Y. Hitoshi, N. Yamaguchi // *J. Immunol.* - 1991. - Vol. 72. - P. 502-507.
363. Kotsimbos, A.T. IL-5 and IL-5 receptor in asthma / A.T. Kotsimbos, Q. Hamid // *J. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* - 1997. - Vol. 92(1). - P. 75-81.
364. Kouro, T. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy / T. Kouro, K. Takatsu. // *J. Inter. Immunol.* - 2009. - Vol. 21(12). - P. 1303-1309.
365. Kubin, R. Interleukin-5 as a differentiation factor for eosinophilic granulocytes. Its biological effects and potential therapeutic uses / R. Kubin // *J. Dtsch. Med. Wochenschr.* - 1992. - Vol. 21(8). - P. 307-312.
366. Kumar, D. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances / D. Kumar, K.V. Rao // *J. Microbes Infect.* - 2011. - Vol. 13(2). - P. 121-133.
367. Kunkel, E.J. Chemokines and the tissuespecific migration of lymphocytes / E.J. Kunkel, E.C. Butcher // *J. Immunity.* - 2002. - Vol. 16. - P. 1-4.
368. Kusano, S. Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its α receptor / S. Kusano, N. Kukimoto-Niino, N. Hino // *J. Protein Sci.* - 2012. - Vol. 21(6). - P. 850-864.
369. Kuz'mina, I.K. Pulmonary tuberculosis in children and adolescents with hyperergic tuberculin susceptibility: clinical and X-ray characteristics and methods of detection / I.K. Kuz'mina, M.F. Gubkina // *J. Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.* - 2009. - Vol. 1. - P. 20-23.

370. Lack of association of CCR3 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese population / Y. Tsunemi, T. Sekiya, H. Saeki et al. // *J. of Dermatol. Sci.* - 2003. - Vol. 33. - P. 130-133.
371. Lacy, P. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils / P. Lacy, R. Moqbel // *J. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92. - 1997. - Vol. 18. - P. 125-133.
372. Lacy, P. Eosinophil cytokines / P. Lacy, R. Moqbel // *J. Chem. Immunol.* - 2000. - Vol. 76. - P. 134-155.
373. Larfars, G. Fludarabine, as well as 2-chlorodeoxyadenosine, can induce eosinophilia during treatment of lymphoid malignancies / G. Larfars, A.M. Uden-Blohme, J. Samuelsson // *Br. J. Haematol.* - 1996. - Vol. 94(4). - P. 709-712.
374. Lasco, T.M. Rapid Accumulation of Eosinophils in Lung Lesions in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis* / T. M. Lasco, O.C. Turner, L. Cassone // *J. Infect. Immun.* - 2004. - Vol. 72(2). - P. 1147-1149.
375. Lee J.-H. Genetic effect of CCR3 and IL5RA gene polymorphisms on eosinophilia in asthmatic patients / J.-H. Lee, H.S. Chang, J.H. Kim // *J. Allergy Clin. immunol.* - 2007. - Vol. 120(5). - P. 1110-1117.
376. Legrand, F. A Functional $\gamma\delta$ TCR/CD3 Complex Distinct from $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils / F. Legrand, V. Driss, G.A. Woerly // *J. PLoS ONE.* - 2009. - Vol. 4(6). - P. 5926-5931.
377. Ligation of Siglec-8: a selective mechanism for induction of human eosinophil apoptosis / E. Nutku, H. Aizawa, S.A. Hudson, B.S. Bochner // *J. Blood.* - 2003. - Vol. 101. - P. 5014-5020.
378. Linch, N.S. Mouse Eosinophils Possess Potent Antibacterial Properties In Vivo / N.S. Linch, A.M. Kelly, T.E. Danielson // *J. Infect. and Immun.* - 2009. - Vol. 77(11). - P. 4976-4982.
379. Linking the Transcriptional Profiles and the Physiological States of *Mycobacterium tuberculosis* during an Extended Intracellular Infection / K.H. Rohde, D.F.T. Veiga, S. Caldwell et al. // *J. Plos Pathogens.* - 2012. - Vol. 8(6). - P. 1-16.
380. Lintomen, L. Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES in vitro: Lack of interaction with nitric oxide / L. Lintomen, G. Franchi, A. Nowill et al. // *J. BMC Pulm. Med.* - 2008. - Vol. 8(13). - P. 1-11.

381. Liu, L.Y. Decreased Expression of Membrane IL-5 Receptor {alpha} on Human Eosinophils: IL-5 Down-Modulates Its Receptor Via a Proteinase-Mediated Process / L.Y. Liu, J.B. Sedgwick, M.E. Bates // *J. Immunol.* - 2002. - Vol. 169(1). - P. 6459-6466.
382. Localization of a molecule immunochemically similar to eosinophil major basic protein in human placenta / D.E. Maddox, G.M. Kephart, C.B. Coulam, J.H. Butterfield, K. Benirschke, G.J. Gleich // *J. Exp. Med.* - 2010. - Vol.160. - P. 29-41.
383. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils / H.Z. Shi, A. Humbles, C. Gerard, Z. Jin, P.F. Weller // *J. Clin. Invest.* - 2000. - Vol. 105. - P. 945-953.
384. Macdonald, D. The 8p11 myeloproliferative syndrome: a distinct clinical entity caused by constitutive activation of FGFR1 / D. Macdonald, A. Reiter, N.C. Cross // *J. Acta Haematol.* - 2002. - Vol. 107. - P. 101-107.
385. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker / D.A. Plager, D.A. Loegering, J.L. Checkel et al. // *J. Immunol.* - 2006. - Vol. 177. - P. 7340-7345.
386. Malek, T.R. Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2 / T.R. Malek, A.L. Bayer // *J. Nat. Rev. Immunol.* - 2004. - Vol. 4(9). - P. 665-674.
387. Marchand, E. Idiopathic chronic eosinophilic pneumonia / E. Marchand, J.-F. Cordier. // *Orphanet J. Rare Dis.* - 2006. - Vol. 1(11). - P.1-11.
388. Markers of antigen presentation and activation on eosinophils and T cells in the esophageal tissue of patients with eosinophilic esophagitis / M. Le-Carlson, S. Seki, D. Abarbanel, A. Quiros, K. Cox, K.C. Nadeau // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* - 2013. - Vol. 56(3). - P. 257-262.
389. Mawhorter, S.D. Human eosinophils as antigen-presenting cells: relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation / S.D. Mawhorter, J.W. Kazura, W.H. Boom // *J. Immunol.* - 1994. - Vol. 81. - P. 584-591.
390. McCoy, M.E. Th2-specific immunity and function of peripheral T cells is regulated by the p56Lck Src homology 3 domain / M.E. McCoy, F.D. Finkelman, D.B. Straus // *J. Immunol.* - 2010. - Vol. 185. - P. 122-127.

391. McNagny, K.M. Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression / K.M. McNagny, T. Graf // *J. Exp. Med.* - 2002. - Vol. 195. - P. 43-47.
392. Mechanisms of eosinophil secretion: large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins / R.C. Melo, L.A. Spencer, A.M. Dvorak, P.F. Weller // *J. Leukoc. Biol.* - 2008. - Vol. 83. - P. 229-236.
393. Mincheva-Nilsson, L. Pregnancy and gamma-delta T cells: taking on the hard questions / L. Mincheva-Nilsson // *J. Science.* - 2003. - Vol. 281. - P.1191-1193.
394. Misregulation of suppressors of cytokine signaling in eosinophilic esophagitis / M.P. Zafra, N. Cancelliere, D.R.P. Rodrigues et al. // *J. Gastroenterol.* - 2012. - Vol. 34. - P. 1-13.
395. Miyara, M. Human FoxP3(+)CD4(+) regulatory T cells: their knowns and unknowns / M. Miyara, S. Sakaguchi // *J. Immunol. Cell Biol.* - 2011. - Vol. 89(3). - P. 346-351.
396. Miyara, M. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression/ M. Miyara, S. Sakaguchi // *J. Trends. Mol. Med.* - 2007. - Vol. 13. - P.108-116.
397. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils / P.D. Ponath, S. Qin, T.W. Post et al. // *J. Exp. Med.* - 1996. - Vol. 183(7). - P. 2437-2448.
398. Molecular cloning of chicken interleukin-5 receptor α -chain and analysis of its binding specificity / Y. Fukushima, T. Miyai, M. Kumagae et al. // *J. Dev. Comp. Immunol.* - 2012. - Vol. 37. - P. 354-362.
399. Molecular Cloning of Human Eotaxin, an Eosinophil-selective CC Chemokine, and Identification of a specific Eosinophil Eotaxin Receptor, CC Chemokine Receptor 3 / M. Kitaura, T. Nakajima, T. Imai et al. // *J. Biol. Chem.* - 1996. - Vol. 271(1). - P. 7725-7730.
400. Molecular organization of the cytokine gene cluster, involving the human IL-3, IL-4, IL-5 and GM-CSF genes, on human chromosome 5 / H.B. Leeuwen Van, M.E. Martinson, G.C. Webb et al. // *J. Cell. Immunol.* - 2003. - Vol. 119(5). - P. 1142-1148.

401. Moore, K. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor / K. Moore, R. de Waal Malefit, R.L. Coffman // *J. Ann. Rev. Immunol.* - 2001. - Vol. 19. - P. 683-765.
402. Mordvinov, V.A. Regulation of IL-5 expression / V.A. Mordvinov, C.J. Sanderson // *J. Arch. Immunol. Ther Exp. (Warsz).* - 2001. - Vol. 49(5). - P. 345-351.
403. Moqbel, R. Differential secretion of cytokines / R. Moqbel, J.J. Coughlin // *J. Sci STKE.* - 2006. - Vol. 338. - P. 26.
404. Munitz, A. 2B4 (CD244) is expressed and functional on human eosinophils / A. Munitz, I. Bachelet, S. Fraenkel // *J. Immunol.* - 2005. - Vol. 174. - P. 110-118.
405. Munitz, A. Inhibitory receptors on eosinophils: a direct hit to a possible Achilles heel? / A. Munitz, F. Levi-Schaffer // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2005. - Vol. 119. - P. 1382-1387.
406. Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression / N. Zimmermann, S.P. Hogan, A. Mishra et al. // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 165. - P. 5839-5846.
407. Murphy, J.M. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor / J.M. Murphy, I.G. Young. // *J. Vitam. Horm.* - 2006. - Vol. 74. - P. 1-30.
408. Nagase, H. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand / H. Nagase, S. Okugawa, Y. Ota // *J. Immunol.* - 2003. - Vol. 171. - P. 3977-3982.
409. Nagase, H. Glucocorticoids preferentially upregulate functional CXCR4 expression in eosinophils / H. Nagase, M. Miyamasu, M. Yamaguchi // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2000. - Vol. 106. - P. 1132-1139.
410. Nakamura, Y. TH2 cytokines and associated transcription factors as therapeutic targets in asthma / Y. Nakamura, M. Hoshino // *J. Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* - 2005. - Vol. 4. - P. 267-270.
411. Namkung, J.-H. IL-5 and IL-5 receptor alpha polymorphisms are associated with atopic dermatitis in Koreans / J.-H. Namkung, J.-E. Lee, E. Kim // *J. Allergy.* - 2007. - Vol. 62(8). - P. 934-942.

412. Nasal cytokine responses to natural colds in asthmatic children / T.C. Lewis, T.A. Henderson, A.R. Carpenter et al. // *J. Clin. Exp. Allergy*. - 2012. - Vol. 42(12). - P. 1734-1744.
413. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation / Y. Kuniyasu, T. Takahashi, M. Itoh et al. // *J. Int. Immunol.* - 2000. - Vol. 12(8). - P. 1145-1155.
414. Nishitani, H. Infiltration of peroxidase-producing eosinophils into the lamina propria of patients with ulcerative colitis / H. Nishitani, M. Okabayashi, M. Satomi // *J. Gastroenterol.* - 1998. - Vol. 33. - P. 189-195.
415. Nopp, A. Quantitative, rather than qualitative, differences in CD69 up-regulation in human blood eosinophils upon activation with selected stimuli / A. Nopp, J. Lundahl, G. Hallden // *J. Allergy*. - 2000. - Vol. 55(2). - P. 148-156.
416. Novel combinatorial interactions of GATA-1, PU.1, and C/EBPepsilon isoforms regulate transcription of the gene encoding eosinophil granule major basic protein / J. Du, M.J. Stankiewicz, Y. Liu et al. // *J. Biol. Chem.* - 2002. - Vol. 277. - P. 43481-43494.
417. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria / C.A. Scanga, V.P. Mohan, K. Tanaka et al. // *J. Immunol. Today*. - 1998 - Vol. 19. - P. 491-494.
418. Odemuyiwa, S.O. Human eosinophils regulate T cell subset selection through indoleamine 2,3-dioxygenase / S.O. Odemuyiwa, A. Ghahary, Y. Li // *J. Immunol.* - 2004. - Vol. 173. - P. 5909-5913.
419. Ohashi, Y. Significance of tumor associated tissue eosinophilia and other inflammatory cell infiltrate in early esophageal squamous cell carcinoma / Y. Ohashi // *J. Anticancer Res.* - 2000. - Vol. 20(8). - P. 3025-3030.
420. Ohno, I. Eosinophils as a source of matrix metalloproteinase-9 in asthmatic airway inflammation / I. Ohno, H. Ohtani, Y. Nitta // *Am J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 1997. - Vol. 16. - P. 212-219.
421. Ontogeny of the eotaxins in human lung / K.J. Haley, M.E. Sunday, Y. Porrata et al. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* - 2008. - Vol. 294. - P. 214-224.

422. Ovalbumin sensitization changes the inflammatory response to subsequent parainfluenza infection: eosinophils mediate airway hyperresponsiveness, M2 muscarinic receptor dysfunction and antiviral effects / D.J. Adamko, B.L. Yost, G.J. Gleich et al. // *J. Exp. Med.* - 1999. - Vol. 199. - P. 1465-1477.
423. p38 MAP kinase regulates rapid matrix metalloproteinase-9 release from eosinophils / S. Wiehler, S.L. Cuvelier, S. Chakrabarti, K.D. Patel // *J. Biochem. Biophys Res. Commun.* - 2004. - Vol. 315. - P. 463-470.
424. Paplinska, M. Role of eotaxin in the pathophysiology of asthma / M. Paplinska, H. Grubek-Jaworska, R. Chazan. // *J. Pneumonol. Alergol. Pol.* - 2007. - Vol. 75(2). - P.180-185.
425. Park, Y.M. Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease / Y.M. Park, B.S. Bochner // *J. Allergy Asthma Immunol. Res.* - 2010. - Vol. 2(2). - P. 87-101.
426. Phagosomal Rupture by Mycobacterium tuberculosis Results in Toxicity and Host Cell Death / R. Simeone, A. Bobard, J. Lippman et al. // *J. Plos. Pathogens.* - 2012. - Vol. 8(2). - P. 1-13.
427. Plager, D.A. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker / D.A. Plager, D.A. Loegering, J.L. Checkel // *J. Immunol.* - 2006. - Vol. 177(10). - P. 7340-7345.
428. Plotz, S.G. The interaction of human peripheral blood eosinophils with bacterial lipopolysaccharide is CD14 dependent / S.G. Plotz, A. Lentschat, H. Behrendt // *J. Blood.* - 2001. - Vol. 97. - P. 235-241.
429. Polymorphisms in the IL-4 and IL-4A genes in Colombian patient with rheumatoid arthritis / O. Moreno, C.I. Gonzalez, D.L. Saaibi et al. // *J. Rheumatol.* - 2007. - Vol. 34(1). - P. 36-42.
430. Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy / M. Kabesch, M. Depner, I. Dahmen et al. // *J. Allergy.* - 2007. - Vol. 62 - P. 423-428.
431. Polymorphisms within inflammatory genes and colorectal cancer / S. Landi, F. Gemignani, F. Bottari et al. // *J. Negat. Results Biomed.* - 2006. - Vol. 5. - P. 1-15.
432. Protection against allergic airway inflammation during the chronic and acute phases of *Trichinella spiralis* infection / C. Aranzamendi, A. de Bruin, R. Kuiper, C.J.

- Boog, W. van Eden, V. Rutten, E. Pinelli // *Clin. Exp. Allergy*. - 2013. - Vol. 43(1). - P.103-115.
433. Raghvan, S. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease / S. Raghvan, J. Holgren // *J. FEMS Immunol. Med. Microbiol.* - 2005. - Vol. 44. - P. 121-127.
434. Regulation of eosinophil membrane depolarization during NADPH oxidase activation / J.L. Bankers-Fulbright, G.J. Gleich, G.M. Kephart, H. Kita // *J. Cell. Science*. - 2003. - Vol. 116. - P. 3221-3226.
435. Rankin, S.M. Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease / S.M. Rankin, D.M. Conroy, T.J. Williams // *J. Mol. Med. Today*. - 2000. - Vol. 6. - P. 20-27.
436. Rasouli, M. Association of the interferon-gamma and interleukin-4 polymorphisms with susceptibility to brucellosis in Iran patients / M. Rasouli // *J. Cytokine*. - 2007. - Vol. 38(1). - P. 49-53.
437. Recombinant human eosinophil-derived neurotoxin/RNase 2 functions as an effective antiviral agent against respiratory syncytial virus / J.B. Domachowske, K.D. Dyer, C.A. Bonville, H.F. Rosenberg // *J. Infect. Dis.* - 1998. - Vol. 177. - P. 1458-1464.
438. Redford, P.S. The role of IL-10 in immune regulation during *M. tuberculosis* infection / P.S. Redford, P.J. Murray, A. O'Garra // *J. Mucos. Immunol.* - 2011. - Vol. 4(3). - P. 261-270.
439. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils / P. Popken-Harris, J. Checkel, D. Loegering et al. // *J. Blood*. - 1998. - Vol. 92. - P. 623-631.
440. Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta / R.E. Rojas, K.N. Balaji, A. Subramanian et al. // *J. Infect. Immun.* - 1999. - Vol. 67(12). - P. 6461-6472.
441. Regulation of human eosinophil NADPH oxidase activity: a central role for PKC δ / J.L. Bankers-Fulbright, H. Kita, G.J. Gleich, S.M. O'Grady // *J. Cell. Physiol.* - 2001. - Vol. 189. - P. 306-315.

442. Regulation of chemokine receptor expression in eosinophils / H. Nagase, M. Miyamasu, M. Yamaguchi et al. // *J. Int. Arch. Allergy Immunol.* - 2001. - Vol. 125(1). - P. 29-32.
443. Regulation of eosinophil membrane depolarization during NADPH oxidase activation / J.L. Bankers-Fulbright, G.J. Gleich, G.M. Kephart, H. Kita // *J. Cell Science.* - 2003. - Vol. 116. - P. 3221-3226.
444. Role of Eotaxin-1 (CCL11) and CC Chemokine Receptor 3 (CCR3) in bleomycin-induced lung injury and fibrosis / F. Huaux, M. Gharaee-Kermani, T. Liu et al. // *J. Am J. of Pathol.* - 2005. - Vol. 167(6). - P. 1485-1496.
445. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis / Y.V.N. Cavalcanti, M.C.A. Brelaz, J.K. Neves et al. // *J. Pulm. Med.* - 2012. - Vol. 2012. - P. 1-10.
446. Role of TGF beta-mediated inflammation in cutaneous wound healing / X. Wang, G. Han, P. Owens et al. // *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* - 2006. - Vol. 11. - P. 112-117.
447. Rothenberg, M.E. The eosinophil / M.E. Rothenberg, S.P. Hogan // *J. Annu Rev. Immunol.* - 2006. - Vol. 24(1). - P. 147-174.
448. Rothenberg, M.E. Eosinophilic gastrointestinal disorders / M.E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2004. - Vol. 113(1). - P. 11-28.
449. Rothenberg, M.E. Eosinophils in the new millennium / M.E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2007. Vol. 11. - P. 1321-1322.
450. Roufosse, F. The hypereosinophilic syndrome revisited / F. Roufosse, E. Cogan // *J. Goldman Annu Rev. Med.* - 2003. - Vol. 54. - P. 169-184.
451. Rubira, G.N. Tumor necrosis factor / G.N. Rubira // *J. Allergol. Immunopathol.* - 2000. - Vol. 28(3). - P. 115-119.
452. Sampson, H.A. Food allergy: Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders / H.A. Sampson // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1999. - Vol. 103. - P. 717-728.
453. Schaffer, J.V. The changing face of graft-versus-host disease / J.V. Schaffer // *J. Semin Cutan. Med. Surg.* - 2006. - Vol. 25. - P. 190-200.

454. Serrano, D. The patterns of IL2, IFN-gamma, IL4 and IL5 gene expression in Hodgkin's disease and reactive lymph nodes are similar / D. Serrano, F. Ghiotto, S. Roncella // *J. Haematol.* - 1997. - Vol. 82(5). - P. 542-549.
455. Serum eotaxin levels in patients with chronic spontaneous urticaria / A. Tedeschi, R. Asero, M. Lorini et al. // *J. Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* - 2012. - Vol. 44(5). - P. 188-192.
456. Shamri, R. Eosinophils in innate immunity: an evolving story / R. Shamri, J.J. Xenakis, L.A. Spencer. // *J. Cell and Tissue Research.* - 2010. - Vol. 343(1). - P. 57-83.
457. Sheppard, D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis / D. Sheppard // *J. Proc. Am. Thorac. Soc.* - 2006. - Vol. 3(5). - P. 413-417.
458. Shevach, E.M. Biological functions of regulatory T cells / E.M. Shevach // *Adv. Immunol.* - 2011. - V. 112. - P. 137-176.
459. Shevach, E.M. Regulatory T cells. Posters / E.M. Shevach, T. Davidson // *Nat. Rev. Immunol.* - 2012. - V. 12(2). - P. 146-147.
460. Shi, H. Eosinophils function as antigen-presenting cells / H. Shi // *J. Leukoc. Biol.* - 2005. - Vol. 76. - P. 520-527.
461. Simultaneous activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human neutrophils / T.E. DeCoursey, V.V. Cherny, W. Zhou, L. Thomas // *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2000. - Vol. 97. - P. 6885-6889.
462. Simon, D. Eosinophilic disorders / D. Simon, H.-U. Simon // *J. Allergy and Clin. Immunol.* - 2007. - Vol. 119. - P. 1291-1300.
463. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4+CD25+ regulatory T cells during autoimmune diabetes / S.M. Pop, C.P. Wong, D.A. Culton et al. // *J. Exp. Med.* - 2005. - Vol. 201(8). - P. 1333-1346.
464. Speirs, R.S. A Role for Eosinophils in Adaptive Humoral Immunity / R.S. Speirs, E.E. Speirs, N.M. Ponzio // *The Open Immunol. J.* - 2009. - Vol. 2. - P. 168-186.
465. Staphylococcus aureus directly activates eosinophils via platelet-activating factor receptor / K. Hosoki, A. Nakamura, M. Nagao, Y. Hiraguchi, H. Tanida, R. Tokuda,

- H. Wada, T. Nobori, S. Suga, T. Fujisawa // *J. Leukoc. Biol.* - 2012. - Vol. 92(2). - P. 333-341.
466. Starke, J.R. Navigating through laboratory reports: Expectations, dreams and realities / J.R. Starke, L. Heifets // *J. Sem. Respir. Crit. Care. Med.* - 1997. - Vol. 18. - P. 509-522.
467. Steinke, J.W. Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and-independent pathways / J.W. Steinke // *J. Immunol.* - 2002. - Vol. 107(3). - P. 306-315.
468. Straumann, A. Anti-eosinophil activity and clinical efficacy of the CRTH2 antagonist OC000459 in eosinophilic esophagitis / A. Straumann, S. Hoesli, Ch. Bussmann, M. Stuck // *Allergy.* - 2013. - Vol. 68(3). - P. 375-385.
469. Structure analysis of the IL-5 ligand-receptor complex reveals a wrench-like architecture for IL-5R α / E. Patino, A. Kotzsch, S. Saremba et al. // *J. Structure.* - 2011. - Vol. 19(12). - P. 1864-1875.
470. Svensson, L. Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups / L. Svensson, C. Wenneras // *J. Microbes Infect.* - 2005. - Vol. 7(4). - P. 720-728.
471. Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth *Heligmosomoides polygyrus* / H.J. McSorley, M.T O'Gorman., N. Blair, T.E. Sutherland, K.J. Filbey, R.M. Maizels // *Eur. J. Immunol.* - 2012. - Vol. 42(10). - P. 2667-2682.
472. Synergistic effects of interleukin-4 or interleukin-13 and tumor necrosis factor-alpha on eosinophil activation in vitro / W. Luttmann, T. Matthiesen, H. Matthys et al. // *Am. J. Respir.* - 1999. - Vol. 20(6). - P. 474-480.
473. Tachimoto, H. The surface phenotype of human eosinophils / H. Tachimoto, B.S. Bochner // *J. Chem. Immunol.* - 2000. - Vol. 76. - P. 45-62.
474. Takatsu, K. IL-5 and eosinophilia / K. Takatsu, H. Nakajima. // *J. Curr. Opin. Immunol.* - 2008. - Vol. 20(3). - P. 288-294.
475. Takatsu, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases / K. Takatsu. // *J. Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys Biol Sci.* - 2011. - Vol. 87(8). - P. 463-485.

476. Takatsu, K. Interleukin-5 in the link between the innate and acquired immune response / K. Takatsu, T. Kouro, Y. Nagai. // *J. Adv. Immunol.* - 2009. - Vol. 101. - P. 191-236.
477. Takatsu, K. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation / K. Takatsu, S. Takaki, Y. Hitoshi // *J. Adv. Immunol.* - 1994. - Vol. 57. - P. 45-90.
478. Tavernier, J. Interleukin 5 regulates the isoform expression of its own receptor α -subunit / J. Tavernier, J. Van der Heyden // *J. Blood.* - 2000. - Vol. 95(5). - P. 1600-1607.
479. Tefferi, A. Blood Eosinophilia: A New Paradigm in Disease Classification, Diagnosis, and Treatment / A. Tefferi // *J. Mayo Clin. Proc.* - 2005. - Vol. 80(1). - P. 75-83.
480. Tefferi, A. Eosinophilia: secondary, clonal and idiopathic / A. Tefferi, M.M. Patnaik, A. Pardanani // *British J. of Haemat.* - 2006. - Vol. 133. - P. 468-492.
481. Tefferi, A. Hypereosinophilic Syndrome and Clonal Eosinophilia: Point-of-Care Diagnostic Algorithm and Treatment Update Mayo // A. Tefferi, J. Gotlib, A. Pardanani // *Clin. Proc.* - 2010. - Vol. 85(2). - P. 158-164.
482. Temkin, V. Mechanism of tumour necrosis factor alpha mediated eosinophil survival / V. Temkin, F. Levi-Schaffer // *J. Cytokine.* - 2001. - Vol. 15(1). - P. 20- 26.
483. Th1 and Th2 cells are required for both eosinophil- and neutrophil-associated airway inflammatory responses in mice / R. Fischer, D. Tome, J. R. McGhee et al. // *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2007. - Vol. 357(1). - P. 44-49.
484. The Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) Is Present in Specific Granules of Human Eosinophils / B.J. Calafat, H. Janssen, A. Too et al. // *J. Blood.* - 1998. - Vol. 91(12). - P. 4770-4775.
485. The GM-CSF receptor family: mechanism of activation and implications for disease / T.R. Hercus, S.E. Broughton, P.G. Ekert et al. // *J. Growth Factors.* - 2012. - Vol. 30 (2). - P. 63-75.
486. The EOL-1 cell line as an in vitro model for the study of FIP1L1-PDGFR α -positive chronic eosinophilic leukemia / J. Cools, H. Quentmeier, B.J. Huntly et al. // *J. Blood.* - 2004. - Vol. 103. - P. 2802-2805.

487. The eotaxin chemokines and CCR3 are fundamental regulators of allergen-induced pulmonary eosinophilia / S.M. Pope, N. Zimmermann, K.F. Stringer, M.L. Karow, M.E. Rothenberg // *J. Immunol.* - 2005. - Vol.175. - 5341-5350.
488. The heart and the eosinophil / J.E. Touze, L. Fourcade, P. Heno et al. // *Med. Trop. (Mars)*. - 1998. - Vol. 58(4). - P. 459-464.
489. The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses / D. Pennington, D. Vermijlen, E. Wise et al. // *J. Advances in Immunol.* - 2005. - Vol. 87. - P. 27-59.
490. The molecular biology of eosinophil granule proteins / K.J. Hamann, R.L. Barker, R.M. Ten, G.J. Gleich // *J. Int. Arch Allergy Appl. Immunol.* - 1991. - Vol. 94. - P. 202-209.
491. Thornton, A.M. Signal transduction in CD4+CD25+ regulatory T cells: CD25 and IL-2 / A.M. Thornton // *J. Front. Biosci.* - 2006. - Vol. 11. - P. 921-927.
492. Thornton, A.M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific / A.M. Thornton, E.M. Shevach // *J. Immunol.* - 2000. - Vol. 164(1). - P. 183-190.
493. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps / M. Morshed, S. Yousefi, C. Stockle et al. // *J. Allergy.* - 2012. - Vol. 67 (9). - P. 1127-1137.
494. Th17 Cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils / S. Al-Muhsen, S. Letuve, A. Vazquez-Tello, M.A. Pureza, H. Al-Jahdali, A.S. Bahammam, Q. Hamid, R. Halwani // *Respir. Res.* - 2013. - Vol. 13, № 14. - P. 34-39.
495. Toll-like Receptor 2 and DC-SIGNR1 Differentially Regulate Suppressors of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection / V. Srivastava, M Manchanda, S. Gupta, R. Singla, D. Behera et al. // *J. Biol. Chem.* - 2009. - Vol. 284(38). - P. 25532-25541.
496. Toll-like Receptor mediated Eosinophil-Basophil Differentiation: autocrine signalling by GM-CSF in cord blood hematopoietic progenitors / P. Reece, A.J. Baatjes, M.M. Cyr, R. Sehmi, J.A. Denburg // *Immunol.* - 2013. - Vol. 23. - P. 12-16.
497. Treatment with campath-1H for relapsed chronic lymphocytic leukemia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation does not abrogate the

- development of chronic GVHD / D. Wolff, B. Steiner, S. Stilgenbauer et al. // *Eur. J. Haematol.* - 2004. - Vol. 72. - P. 145-148.
498. Uhm, T.G. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma / T.G. Uhm, B.S. Kim, I.Y. Chung // *Allergy Asthma Immunol. Res.* - 2012. - Vol. 4(2). P. 68-79.
499. Ultrastructural localization of vesicle-associated membrane protein(s) to specialized membrane structures in human pericytes, vascular smooth muscle cells, endothelial cells, neutrophils, and eosinophils / D. Feng, R. Flaumenhaft, C. Bandeira-Melo, P. Weller, A. Dvorak // *J. Histochem. Cytochem.* - 2001. - Vol. 49. - P. 293-304.
500. Use of 111-Indium-labeled autologous eosinophils to establish the in vivo kinetics of human eosinophils in healthy subjects / N. Farahi, N.R. Singh, S. Heard, C. Loutsios, C. Summers, C.K. Solanki, K. Solanki, K.K. Balan, P. Ruparelia, A.M. Peters, A.M. Condliffe, E.R. Chilvers // *J. Blood.* - 2012. - Vol. - 8(120). - P. 4068-4071.
501. Vahlenamp, T.W. The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infections / T.W. Vahlenamp, M.B. Tompkins, W.A. Tompkins // *J. Vet. Immunol. Immunopathol.* - 2005. Vol. 108(1-2). - P. 219-225.
502. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein / R.C. Melo, L.A. Spencer, S.A. Perez et al. // *J. Lab. Invest.* - 2009 - Vol. 89. - P. 769-781.
503. Voehringer, D. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production / D. Voehringer, K. Shinkai, R.M. Locksley // *J. Immunity.* - 2004. - Vol. 20. - P. 267-277.
504. Wang J. Eosinophilic inflammation: mechanisms regulating IL-5 transcription in human T lymphocytes / J. Wang, I.G. Young // *J. Allergy.* - 2007. - Vol. 62. - P. 1131-1138.
505. Wang, J. Role of eosinophil peroxidase in host defense and disease pathology / J. Wang, A. Slungaard // *J. Arch. Biochem. Biophys.* - 2006. - Vol. 445. - P. 256-260.

506. Wardlaw, A.J. Molecular basis for selective eosinophil trafficking in asthma: a multistep paradigm / A.J. Wardlaw // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1999. - Vol. 104. - P. 917-926.
507. Weiner, M.P. Introduction to SNPs: Discovery of markers for diseases / M.P. Weiner, T.J. Hudson // *J. Biotechniques.* - 2002. - Vol. 10. - P. 12-13.
508. Welin, A. Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis* / A. Welin, M. Lerm // *J. Tuberculosis.* - 2012. - Vol. 92 (2). - P. 113-120.
509. Wolterink, R.G. Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma / R.G. Wolterink, A. Kleinjan, M. Nimwegen // *Eur. J. Immunol.* - 2012. - Vol. 42(5). - P. 1106-1116.
510. Wong, T.W. Purification of functional eosinophils from human bone marrow / T.W. Wong, D.F. Jelinek // *J Immunol. Methods.* - 2013. - Vol. 387(1-2). - P. 130-139.
511. Yousefi, S. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense / S. Yousefi // *J. Nat. Med.* - 2008. - Vol. 14. - P. 949.
512. Yousefi, S. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease / S. Yousefi, D. Simon, H.U. Simon // *J. Curr. Opin. Immunol.* - 2012. - Vol. 24 (6). - P. 736-739.
513. Yu, C. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo / C. Yu, A.B. Cantor, H. Yang // *J. Exp. Med.* - 2002. - Vol. 195. - P. 1387-1395.
514. Zhang, M. Long-term follow-up of adults with acute lymphoblastic leukemia in first remission treated with chemotherapy or bone marrow transplantation / M. Zhang // *J. Ann. Intern. Med.* - 1995. - Vol. 123. - P. 428.