

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

На правах рукописи

Михеева Ксения Олеговна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ФОРМИРОВАНИЯ  
ЭОЗИНОФИЛИИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

14.03.03 – патологическая физиология

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

**Диссертация**

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

академик РАН,

Заслуженный деятель науки России

В.В. Новицкий

доктор медицинских наук,

профессор О.И. Уразова

Томск-2013

## Содержание

<b>Список сокращений</b> .....	4
<b>Введение</b> .....	6
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	12
<b>1.1. Эпидемиология туберкулеза легких</b> .....	12
<b>1.2. Общие сведения об этиопатогенезе туберкулезной инфекции</b> .....	13
<b>1.3. Иммунопатогенез туберкулезной инфекции</b> .....	17
<b>1.4. Современные представления о строении и функциональных особенностях эозинофилов в норме и при патологии</b> .....	23
<b>1.5. Механизмы развития эозинофилии крови при патологии</b> .....	28
<b>1.6. Структурные основы функционального полиморфизма генов цитокинов</b> .....	39
<b>1.7. Связь аллельного полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов с формированием эозинофилии при заболеваниях</b> .....	41
<b>Глава 2. Материал и методы исследования</b> .....	49
<b>2.1. Общая характеристика клинического материала</b> .....	49
<b>2.2. Материал исследования</b> .....	51
<b>2.3. Методы исследования</b> .....	51
<b>2.3.1. Определение общего количества лейкоцитов в периферической крови</b> .....	51
<b>2.3.2. Подсчет лейкоцитарной формулы</b> .....	52
<b>2.3.3. Выделение и культивирование эозинофильных гранулоцитов периферической крови</b> .....	52
<b>2.3.4. Определение содержания цитокинов в крови и супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов</b> .....	54
<b>2.3.5. Определение мембраносвязанных форм цитокиновых рецепторов на эозинофильных гранулоцитах крови</b> .....	55
<b>2.3.6. Выделение ДНК</b> .....	57
<b>2.3.7. Исследование аллельного полиморфизма генов цитокинов и их</b>	

рецепторов.....	58
<b>2.3.8.</b> Определение CD3 <sup>+</sup> и CD20 <sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови	60
<b>2.4.</b> Статистический анализ результатов исследования.....	61
<b>Глава 3. Результаты исследования</b> .....	63
<b>3.1.</b> Количественные показатели лейкоцитарного звена у больных туберкулезом легких.....	63
<b>3.2.</b> Содержание IL-5 и эотаксина в крови у больных туберкулезом легких .....	63
<b>3.3.</b> Содержание IL-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких.....	65
<b>3.4.</b> Содержание IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в <i>in vitro</i> культуре эозинофилов крови у больных туберкулезом легких .....	67
<b>3.5.</b> Анализ распределения генотипов и аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов у больных туберкулезом легких.....	72
<b>3.6.</b> Связь аллельного полиморфизма иммунорегуляторных генов с содержанием цитокинов в крови и IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в <i>in vitro</i> культуре эозинофилов крови у больных туберкулезом легких.....	77
<b>3.7.</b> Содержание CD3 <sup>+</sup> и CD20 <sup>+</sup> лимфоцитов и IFN- $\gamma$ в крови у больных туберкулезом легких .....	84
<b>Глава 4. Обсуждение результатов исследования</b> .....	87
<b>Заключение</b> .....	112
<b>Выводы</b> .....	114
<b>Список литературы</b> .....	115

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АПК – антигенпрезентирующая клетка

АМК – активные метаболиты кислорода

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа

ДК – дендритная клетка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких

ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких

ИФА – иммуноферментный анализ

КСФ – колониестимулирующий фактор

МБТ – микобактерии туберкулеза

МСБ – маннозо-связывающий белок

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОКЛ – общее количество лейкоцитов

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

ФГА – фитогемагглютинин

ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты

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

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

CD (clusters of differentiation) – дифференцировочные антигены

dNTP – дидезоксинуклеотидтрифосфат

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

Ig (immunoglobulin) – иммуноглобулин

IL (interleukin) – интерлейкин

HIV (human immunodeficiency virus) – вирус иммунодефицита человека

HLA (human leukocyte antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген

MBP (major basic protein) – главный основной протеин

M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) – макрофагальный колониестимулирующий фактор

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

NK (natural killers) – натуральные киллеры

NO (nitric oxide) – оксид азота

Pg (prostaglandin) – простагландин

PPD (purified protein derivate) – туберкулин

SNP (single-nucleotide polymorphism) – полиморфизм единичных нуклеотидов

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 опухолей

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

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

## Введение

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

Формирование эозинофилии крови при патологических процессах связывают с гиперпродукцией ключевых медиаторов пролиферации, дифференцировки и рекрутирования эозинофильных гранулоцитов – интерлейкина 5 (IL-5) и эотаксина, индуцирующих при взаимодействии со специфическими клеточными рецепторами (IL-5RA и CCR3) хемотаксис и эффекторные функции клеток [Wise E. L. et al., 2010; Endo Y. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012; Zafra M. P. et al., 2012].

Одним из главных факторов, оказывающих влияние на активность цитокинов и их рецепторов у отдельного индивида, является аллельный полиморфизм иммунорегуляторных генов. Необходимо отметить, что наибольшее количество аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов установлено для их промоторов. Мутации в промоторах, влияя на

уровень экспрессии контролируемого гена, не изменяют структуру кодируемых генами продуктов [Кононенко В. И. и соавт., 2006; Pullat et al., 2007]. В современной литературе представлены многочисленные данные о наличии ассоциативных связей аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов с характером экспрессии соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к той или иной патологии [Онищенко Г. Г. и соавт., 2008; Attab K. A., 2008; Ризванова Ф. Ф. и соавт., 2010; Шевченко А. В. и соавт., 2010; Wise E. L. et al., 2010; Zhu W. et al., 2010; Цыган В. Н. и соавт., 2011]. Так, показано, что полиморфные сайты *C-703T* гена *IL5*, *G-80A* гена *IL5R*, *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3* ассоциированы с уровнем продукции соответствующих цитокинов, экспрессией рецепторов и количеством эозинофилов в периферической крови [Карпова А. В., 2009; Al-Abdulhadi S. A. et al., 2010; Wang T.-N. et al., 2010; Innoue N. et al., 2011].

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

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

**Задачи исследования:**

1. Оценить содержание ИЛ-5 (в крови, супернатантах культуральных суспензий интактных и BCG-индуцированных эозинофилов), эотаксина (в крови) и экспрессию на эозинофилах комплементарных им рецепторов (*IL5RA*, *CCR3*) у больных туберкулезом легких с эозинофилией и без таковой.
2. Проанализировать у больных туберкулезом легких ассоциацию аллельных вариантов промоторных регионов *G-80A* гена *IL5RA*, *T-51C* гена *CCR3*, *C-703T* гена *IL5* и *A-384G* гена *эотаксина* с экспрессией на эозинофилах соответствующих рецепторов, концентрацией цитокинов и содержанием эозинофильных гранулоцитов в крови.

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

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

**Научная новизна.** Впервые проведено исследование молекулярно-генетических механизмов формирования эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких. Показано, что эозинофилия, сопровождающая течение туберкулеза легких, обусловлена повышением содержания IL-5 и эотаксина в крови, гиперсекрецией IL-5 и активацией экспрессии комплементарных ему рецепторов (*IL-5RA*) эозинофильными гранулоцитами. Оценена связь аллельного полиморфизма генов (*IL5*, *IL5RA*, эотаксина и *CCR3*) с концентрацией соответствующих цитокинов, экспрессией цитокиновых рецепторов и количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической крови при туберкулезе легких. Показано, что эозинофилия крови при туберкулезе легких сопряжена с носительством генотипов *CC* (*C-703T*) гена *IL5*, *GG* (*A-384G*) гена эотаксина и *CC* (*T-51C*) гена *CCR3*. Установлена ассоциация генотипов *CC* (*C-703T*) гена *IL5* и *GG* (*A-384G*) гена эотаксина с повышенным содержанием IL-5 и эотаксина в крови у больных туберкулезом легких. При этом выявлено, что увеличение числа IL-5RA-позитивных эозинофилов в крови при туберкулезе легких, сопровождающемся эозинофилией, не связано с аллельным полиморфизмом *G-80A* гена *IL5RA*. Впервые проведен анализ отдельных параметров клеточного (Th1-ассоциированного) и гуморального (Th2-ассоциированного) иммунного ответа у больных туберкулезом легких в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови. Установлено, что эозинофилия при туберкулезе легких сочетается с повышением абсолютного содержания CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов и концентрации IL-5 в условиях дефицита IFN- $\gamma$  в крови, что может свидетельствовать о способности эозинофилов при повышении их количества смещать Th1/Th2-баланс, поляризуя иммунный



ответ в направлении гуморальных (Th2-ассоциированных) реакций.

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

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Эозинофилия у больных туберкулезом легких до лечения противотуберкулезными препаратами сопряжена с гиперсекрецией эозинофильными гранулоцитами IL-5, увеличением содержания эотаксина, IL-5 и IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в крови, а также с носительством аллеля *C* и генотипа *CC* (*C-703T*) гена *IL5*, аллеля *G* и генотипа *GG* (*A-384G*) гена *эотаксина* и аллеля *C* и генотипа *CC* (*T-51C*) гена *CCR3*.
2. Сочетанная роль повышенной секреции IL-5 и экспрессии IL-5RA эозинофилами в развитии гемической эозинофилии при туберкулезе легких подтверждается отсутствием их у больных без эозинофилии и еще более выраженным повышением при индукции эозинофилов *in vitro* рекомбинантным IL-5 и антигеном (BCG).
3. У больных туберкулезом легких с эозинофилией повышенное содержание IL-5 и эотаксина в крови ассоциировано с генотипами *CC* (*C-703T*) гена *IL5* и *GG* (*A-384G*) гена *эотаксина*. При этом увеличение содержания IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в крови не связано с полиморфизмом *G-80A* гена *IL5RA*.
4. Гемическая эозинофилия при туберкулезе легких сочетается с

увеличением абсолютного содержания CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов и концентрации IL-5 в условиях дефицита IFN-γ в крови.

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

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

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

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

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

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

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Эпидемиология туберкулеза легких

В 1993 году туберкулез легких (ТЛ) был объявлен глобальной опасностью для человечества. По данным Всемирной организации здравоохранения, около трети населения планеты инфицированы микобактериями туберкулеза (МБТ), причем подавляющее большинство из них имеют латентную, неактивную форму болезни, которая у 8-10 млн. ежегодно переходит в фазу активации. Ежегодно в мире умирает 3-5 млн. человек от ТЛ, что составляет 25% всех смертей. В период до 2020 г. ожидается около 1 млрд. новых случаев заражения *Mycobacterium tuberculosis*, если не произойдет существенного улучшения контроля над распространением инфекции [Романенко Ф. В., 2006; Шкарин А. В., 2008; Корецкая Н. М., 2011].

Современное положение с ТЛ в России следует характеризовать как серьезную и бурно нарастающую эпидемию. Это заболевание занимает первое место среди всех инфекций и продолжает быстро распространяться. Несмотря на то, что в период с 2001 по 2004 гг. регистрировалось снижение общей заболеваемости ТЛ с 88,5 до 83,1 случаев на 100 000 населения, заболеваемость среди постоянного населения Российской Федерации продолжает расти [Богун А. Г., 2007]. В 2009 году было выявлено 117227 новых случаев заболевания туберкулезной инфекцией (82,6 на 100000 населения), что на 2,9% меньше аналогичного показателя в 2008 году, однако в 13-20 раз превышает показатели заболеваемости ТЛ во многих развитых странах. В 2011 году показатель смертности составил 16,5 на 100 тысяч человек [Зими́на В. Н. и соавт., 2011].

Особенно тяжелая ситуация по заболеваемости ТЛ в России зарегистрирована на Дальнем Востоке, в Сибири, в районах Северного Кавказа, Калмыкии и среди народов Крайнего Севера [Мякишева Т. В., Мишин В. Ю., 2011; Шилова М. В., 2012].

Таким образом, в настоящее время эпидемиологическая ситуация по ТЛ

неблагоприятная и имеет тенденцию к ухудшению.

## 1.2. Общие сведения об этиопатогенезе туберкулезной инфекции

Туберкулез легких – это инфекционно-аллергическое заболевание, патогенетической основой которого является длительное вегетирование и персистирование МБТ в организме человека [Перельман М. И., 2003; Мишин В. Ю., 2007].

Род *Mycobacterium* включает более 85 видов грамположительных, в основном сапрофитных бактерий, живущих в почве, воде и других субстратах. Для человека патогенными являются только три вида *M. tuberculosis*, *M. leprae* и *M. ulcerans*. Кроме того, ряд микобактерий, например *M. microti*, *M. bovis* (BCG - *Bacillus Calmette-Guerin* – бацилла Кальметта-Герена), *M. avium*, вызывают инфекционные заболевания у животных [Свистунов В. В., 2011].

МБТ внешне представляют собой тонкие изогнутые палочки, стойкие к кислотам, щелочам и высыханию. Наружная оболочка бактерии содержит сложные воска и гликолипиды. С липидной фракцией внешней оболочки МБТ связывают устойчивость возбудителя туберкулеза к кислотам, щелочам и спиртам [Покровский В. И., Поздеев О. К., 2001; Шкурупий В. А., 2007].

Установлена генетическая структура МБТ: нуклеотидная последовательность насчитывает 4411529 пар нуклеотидов, из которых 65,6% приходится на долю гуанина и цитозина, что отражается на аминокислотном составе бактериальных белков [Воронкова О.В. и соавт., 2007; Свистунов В. В., 2011].

Самостоятельным движением МБТ не обладают. Температурные границы роста находятся между 29 °С и 42 °С (оптимальная – 37-38 °С). Микобактерии обладают устойчивостью к физическим и химическим агентам; они сохраняют жизнеспособность при очень низких температурах, а повышение температуры до 80 °С могут выдерживать в течение 5 мин. Во внешней среде МБТ достаточно устойчивы, в воде они могут сохраняться до

150 дней [Воробьев А. А., Быков А. С., 2003].

В экспериментах на животных показана большая вариабельность клинических и патологических ответов, вызываемых штаммами МБТ, принадлежащими к различным генотипам. Различия в генотипах коррелируют с различиями в вирулентности микобактериальных штаммов, патологическими процессами в легких и обсемененностью их внутренних органов [Богун А. Г., 2007; Simeone R. et al., 2012].

Как упоминалось ранее, ТЛ – инфекционное заболевание, характеризующееся образованием очагов гранулематозного воспаления в легких. Наиболее распространенными формами являются инфильтративный (ИТЛ) и диссеминированный (ДТЛ) туберкулез легких [Кошечкин В. А. и соавт., 2007].

ИТЛ характеризуется наличием в легких воспалительных изменений, преимущественно экссудативного характера с казеозным некрозом в центре и относительно быстрой динамикой процесса (рассасывание или распад). Для всех клинико-рентгенологических вариантов ИТЛ характерно наличие инфильтративных теней, часто с распадом, возможно бронхогенное обсеменение. Данную клиническую форму диагностируют в 65-75% случаев впервые выявленного туберкулеза легких. При этом заболевают ИТЛ в основном взрослые, чаще молодого возраста. Летальный исход можно наблюдать при возникновении таких осложнений как казеозная пневмония и легочное кровотечение [Перельман М. И., Корякин В. А., 2004; Шовкун, Л. А. и соавт., 2010].

В свою очередь, ДТЛ характеризуется наличием множественных специфических очагов в легких, в начале заболевания возникает преимущественно экссудативно-некротическая реакция с последующим развитием продуктивного воспаления. В зависимости от пути распространения МБТ различают гематогенный и лимфо-бронхогенный ДТЛ [Перельман М. И., 2003]. Среди впервые выявленных больных туберкулезом легких ДТЛ диагностируют у 5-9 %, среди состоящих на учете в

противотуберкулёзных диспансерах – у 12-15%. Дети и подростки заболевают ДТЛ реже. Как причина смерти диссеминированный туберкулез среди всех форм ТЛ составляет 3-10% [Перельман М. И. и соавт., 2007].

Известно, что основными входными воротами для МБТ является респираторный тракт, откуда в норме они удаляются посредством мукоцилиарного клиренса. Движение слизи по эпителиальным цилиарным клеткам в мелких воздушных путях составляет 0,5-1,0 мм/мин, а в больших – 5-20 мм/мин. Первой линией защиты дыхательной системы от проникновения инородных частиц является также аэродинамический барьер [Свищевская Е. В. и соавт., 2005].

Поверхностный слой слизистого эпителия респираторного тракта содержит множество гуморальных факторов, способствующих его бактерицидности. Многими авторами показано, что в основе генетической предрасположенности к туберкулезу лежит дефект системы поверхностно-активных молекул, к которым относятся маннозо-связывающий белок (МСБ), белки-сурфактанты А и Д, коллектины и пентраксины [Simeone R. et al., 2012]. Обсуждают существование и других, еще не идентифицированных молекул.

Так, МСБ является основным опсонизирующим белком врожденного иммунитета [Taramelli D. et al., 2003]. По данным S. Banerjee [2011], среди больных ТЛ крайне редко отмечается низкий уровень экспрессии МСБ. Однако исследователями была установлена связь между определенными аллелями генов МСБ, ассоциированными с чувствительностью к ТЛ. Полиморфизм белков системы сурфактантов также может быть ассоциирован с туберкулезом. Показано, что мутации в трех разных генах, связанных с продукцией и функционированием сурфактантов, приводят к дефициту этих белков и ассоциированы с рядом острых и хронических болезней легких [Taramelli D. et al., 2003]. Недостаточность сурфактантов А и Д при ТЛ является прогностически неблагоприятным фактором, поскольку эти белки обладают прямым антимикробным действием и способны ингибировать рост

бактерий и грибов за счет увеличения их проницаемости и доступности для связи с коллектинами, которые впоследствии облегчают фагоцитоз бактерий и спор грибов [Свищевская Е. В. и соавт., 2005; Plessis N. et al., 2012].

Еще одним классом молекул, принимающих участие в клиренсе патогенов с поверхности слизистой оболочки легких, являются пентраксины - суперсемейство консервативных белков, имеющих циклическую мультимерную структуру. Была доказана ассоциация между экспрессией пентраксинов и ТЛ [Kumar M. et al., 2012]. В целом, дефекты клиренса различных веществ с поверхности слизистой оболочки воздухоносных путей могут приводить к более длительному удержанию МБТ, что облегчает их инвазию в ткани за счет продукции ими протеаз и токсинов.

Имеющиеся нарушения в системе мукоцилиарного клиренса могут быть компенсированы за счет эффективного функционирования фагоцитоза, являющегося фундаментальным биологическим процессом, необходимым для эффективного удаления патогенов. Известно, что формирование фагосомы запускает запрограммированный процесс созревания фаголизосомы, который, в свою очередь, контролируют  $Ca^{2+}$  и регуляторы движения органелл вокруг малых GTP (guanosine triphosphatases)-связывающих белков Rabs и эффекторных молекул активируемого каскада (липидных киназ; молекул, связанных с органеллами; аппарата слияния мембран) [Banerjee S. et al., 2011; Rohde K. H. et al., 2012]. За счет нарушения Rab-контролируемого движения мембран и препятствия созреванию фагосомы (на стадии, когда патоген для лизосомальных ферментов недоступен, но имеет возможность получать факторы питания) МБТ способны выживать и реплицироваться внутри фаголизосом фагоцитирующих клеток. Этот процесс, называемый «арестом созревания фагосом», является критичным для выживания МБТ [Железникова Г. Ф., 2006; Kumar D., Rao K. V., 2011; Welin A., Lerm M., 2012].

В качестве фагоцитирующих клеток могут выступать многие клетки, в том числе, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы и эозинофильные



гранулоциты, способные распознавать, связывать и нейтрализовать МБТ. Распознавание происходит с помощью TLR (Toll-like receptor - Toll-подобный рецептор), основным лигандом для которого на поверхности МБТ является арабиноманан. В распознавании арабиноманана принимают участие TLR2 и TLR4 [Quesniaux V. et al., 2004]. Распознавание арабиноманана осуществляется, вероятно, также через взаимодействие с поверхностно-активными белками – сурфактантами SP-A и SP-D, которые играют определенную роль в противомикробной защите за счет агглютинации бактерий и усиления фагоцитоза [Cavalcanti, Y. V. N. et al., 2012].

Таким образом, способность эффективно удалять патогены с поверхности слизистой оболочки респираторного тракта, а также устойчивость фагоцитов к внутрифагосомальным возбудителям инфекций являются основными протективными факторами при защите от ТЛ. В большинстве случаев при низкой антигенной нагрузке (единичные МБТ) элиминация патогена происходит «силами» врожденного иммунитета. Однако в ряде случаев механизмов врожденной резистентности оказывается недостаточно. Тогда активируется система приобретенного иммунитета, которая формирует специфический, адресный иммунный ответ - иммунитет к возбудителю ТЛ [Kumar D., Rao K. V., 2011; Welin A., Lerm M., 2012].

### **1.3. Иммунопатогенез туберкулёзной инфекции**

Туберкулезная инфекция является примером аллергии – гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Основными клетками-эффекторами ГЗТ являются  $CD4^+$  Т-лимфоциты-хелперы 1-го типа (Th1),  $CD8^+$  Т-клетки и макрофаги [Воронкова О. В. и соавт., 2007; Шкурупий В. А., 2007].

Общий механизм специфического иммунного ответа при попадании МБТ в легкие можно описать следующим образом. При стимуляции фагоцитирующих клеток различными структурами патогенов происходит секреция интерферона (IFN)  $\gamma$ , фактора некроза опухолей (TNF)  $\alpha$ ,

интерлейкина (IL) 1, IL-6, IL-8, а также ряда хемокинов, что стимулирует не только фагоцитоз и хоминг нейтрофилов, но и обеспечивает миграцию лимфоцитов к месту реакции [Kumar M. et al., 2012].

Активация Т-лимфоцитов происходит в лимфатических узлах, куда мигрирует часть нагруженных антигеном макрофагов и дендритных клеток (ДК). Макрофаги и ДК являются не только фагоцитами, но также и антигенпредставляющими клетками (АПК), объединяющими врожденный и антигенспецифический иммунный ответ. В процессе фагоцитоза АПК «процессируют» антигены туберкулезных микобактерий и представляют их пептиды на собственной поверхности в контексте молекул HLA II. Т-клетки хелперного ряда, несущие маркер CD4<sup>+</sup>, распознают именно комплекс молекулы HLA II (human leukocyte antigen II – человеческий лейкоцитарный антиген II) с пептидами антигенов. В результате распознавания такого комплекса CD4<sup>+</sup>-Th0 могут дифференцироваться либо в Th1, либо в Th2. Путь, по которому пройдет дифференцировка, зависит от того, какие цитокины присутствуют в микроокружении клетки. Такие цитокины, как IL-12, IL-18 направляют дифференцировку в сторону образования лимфоцитов Th1 [Лядова И. В. и соавт., 2009; Rohde K. H. et al., 2012]. Активированные Th1 возвращаются в легкие за счет связывания с молекулами адгезии на эндотелии сосудов. Кооперация между макрофагами и Th1 помогает формированию гранулемы вокруг места гибели инфицированных макрофагов [Sugawara I. et al., 2004; Cavalcanti, Y. V. N. et al., 2012].

Ключевой механизм эффекторного действия Т-лимфоцитов заключается в секреции растворимых медиаторов воспаления и прямой цитотоксичности по отношению к инфицированным клеткам. К цитокинам, продуцируемым Т-лимфоцитами и играющим важную роль в патогенезе ТЛ, относятся IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-17, обладающие провоспалительными свойствами и привлекающие в зону воспалительной реакции лимфоциты и моноциты [Имангулова М. М. и соавт., 2005; Banerjee S. et al., 2011; Павлов В. А. и соавт., 2011].

Так, например, IL-2 направляет дифференцировку Th0 в Th1 и регулирует интенсивность реакции ГЗТ. IL-2 способен стимулировать синтез других провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ), а также активировать фагоцитарную активность и бактерицидные свойства ключевых эффекторов противотуберкулезного иммунитета - макрофагов. По данным И.Я. Сахаровой и соавт. [2005], угнетение синтеза IL-2 при ТЛ ведет к снижению количественных и качественных показателей клеточного иммунного ответа, своего рода иммунодепрессии, выраженность которого соответствует тяжести инфекционного процесса.

Решающее значение для программирования дифференцировки Th0 в направлении Th1 имеет также IL-12. Именно с индукцией синтеза в макрофагах IL-12 связывают адъювантное действие МБТ и лечебный эффект BCG. По данным литературы, протективные эффекты IL-12 опосредованы IFN- $\gamma$ -зависимыми механизмами – усиленной продукцией оксида азота, Т-клеточной инфильтрацией, увеличением экспрессии адгезивных молекул и продукции хемокинов, стимуляцией цитотоксической активности естественных киллеров и цитотоксических лимфоцитов [Воронкова О.В. и соавт., 2007; Павлов В. А. и соавт., 2011].

Среди ключевых цитокинов клеточного звена иммунного ответа выделяют IFN- $\gamma$ , который секретируется CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитами, а также гамма-дельта ( $\gamma\delta$ ) Т-лимфоцитами, натуральными киллерами (NK) и NKT-клетками. Основными клетками-мишенями IFN- $\gamma$  являются макрофаги: под действием IFN- $\gamma$  на них увеличивается экспрессия HLA II, активируются процессы фагоцитоза и созревания фаголизосом, происходит продукция нитрит- и супероксид-анионов, которые обладают антибактериальной активностью [Cavalcanti, Y. V. N. et al., 2012]. Показано также участие IFN- $\gamma$  в подавлении образования Th17, в связи с чем предполагается, что он обладает иммунорегуляторной активностью и при микобактериальных инфекциях может служить фактором подавления воспаления [Гергерт В.Я. и

соавт., 1995; Зоркальцева Е.Ю. и соавт., 2005].

К медиаторам с провоспалительной активностью относится TNF- $\alpha$ , стимулирующий антимикобактериальную функцию макрофагов и участвующий в образовании туберкулезной гранулемы [Cavalcanti, Y. V. N. et al., 2012]. Протективная роль TNF- $\alpha$  подтверждается наблюдениями А. И. Аутеншлюс и соавт. [2005], констатирующими тяжелое течение ТЛ у мышей-нокаутов по гену TNF- $\alpha$ ; у таких животных отмечалось нарушение процесса гранулемообразования, исчезновение из гранулем гигантских эпителиоидных клеток, снижение продукции нитрит-аниона, существенное увеличение числа МБТ в органах и выраженные некротические изменения тканей.

Таким образом, основная функция цитокинов клеточного звена иммунитета заключается в стимуляции антибактериальной активности макрофагов и привлечении иммунокомпетентных клеток в очаг туберкулезного воспаления с усилением их цитотоксичности [Лядова И. В. и соавт., 2009; Салина Т. Ю., Морозова Т. И., 2010].

Адекватное функционирование цитотоксических Т-лимфоцитов в защите от МБТ представляется крайне важным. Еще в 1987 К. Muller et al. в своих исследованиях доказали участие CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов в механизмах элиминации МБТ из ткани селезенки экспериментальной линии мышей (gene disrupted). Этим результатам придается особое значение, так как впервые были получены убедительные экспериментальные данные о роли CD8<sup>+</sup>-презентирующих Т-лимфоцитов в формировании противотуберкулезного иммунитета. У мышей генетической линии gene disrupted обнаруживался генетический дефект продукции b<sub>2</sub>-микроглобулина (b<sub>2</sub>m), оказывающего существенное влияние на функциональную активность HLA I. Данные изменения снижают цитотоксическую активность CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов, что проявляется в уменьшении контроля над туберкулезным процессом. Антимикробная активность цитотоксических Т-клеток может достигаться несколькими путями: за счет продукции и секреции таких цитокинов, как IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , а также прямого перфорин-опосредованного повреждающего

действия инфицированных клеток [Cavalcanti, Y. V. N. et al., 2012].

Другие, не столь многочисленные, популяции Т-лимфоцитов также вносят существенный вклад в формирование противотуберкулезного иммунитета. По некоторым данным, ответ  $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов на антигены МБТ в тестах *in vitro* был зарегистрирован у больных с благоприятным течением туберкулезной инфекции и с положительной кожной пробой и, напротив, отсутствовал у больных с прогрессирующим или милиарным ТЛ. В современной литературе также продемонстрировано участие НКТ-клеток с фенотипом  $CD4^-CD8^+$ ,  $TCR_{\alpha\beta}^+CD4^-CD8^-$  и  $TCR_{\alpha\beta}^{int}CD4^+$  в процессах гранулемообразования и продукции IFN- $\gamma$  на ранних стадиях туберкулезной инфекции [Лядова И. В. и соавт., 2009; Павлов В. А. и соавт., 2011].

Особое внимание исследователей сосредоточено на субпопуляции лимфоцитов Трег (регуляторные Т-клетки), отличительной чертой которых является высокий уровень экспрессии поверхностного маркера CD25 ( $\alpha$ -цепь рецептора к IL-2) и наличие внутриклеточного транскрипционного фактора FoxP3. За счет секреции иммуносупрессорных цитокинов, прежде всего IL-10 и трансформирующего фактора роста (TGF)  $\beta$ , Трег снижают интенсивность иммунных реакций и тем самым препятствуют формированию гранулемы [Воронкова О. В. и соавт., 2007]. Избыточная продукция данных цитокинов может привести к недостаточному подавлению ТЛ [Имангулова М. М. и соавт., 2005]. Почти все исследователи, анализировавшие количество Трег, сообщают о высоком их содержании у больных ТЛ [Лядова И. В., Гергерт В. Я., 2011; Суханов Д. С. и соавт., 2011]. При этом в экспериментах *in vitro* истощение регуляторных Т-клеток сопровождалось усилением протективного иммунного ответа [Mai J. et al., 2010]. Е.Г. Чуриной и соавт. [2011] показано, что ведущую роль в формировании иммуносупрессии при ИТЛ, ДТЛ и ФКТЛ играют Т-reg с иммунофенотипом  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ . При этом их количество в крови повышено у больных как при лекарственно-резистентном, так и при лекарственно-чувствительном ТЛ.

Наряду с активацией иммунного Th1-ответа на МБТ одновременно

происходит запуск гуморального звена иммунитета. Ряд авторов указывает на отсутствие протективности антител, вырабатываемых В-лимфоцитами, исключая их роль в патогенезе ТЛ [Маянский А.Н., 2001]. Однако роль В-лимфоцитов довольно значима уже при первичном проникновении МБТ в макроорганизм. Конструктивно синтезируемые антитела нейтрализуют токсины, увеличивают депозицию комплемента на бактериальной поверхности, опсонизируют бактерии к фагоцитозу, в качестве В-клеточных рецепторов связывают антиген, участвуют в процессах антителозависимой клеточной цитотоксичности [Авдиенко В. Г. и соавт., 2002]. Патологический процесс при туберкулезе сопровождается в первую очередь синтезом иммуноглобулинов Ig G, и только потом IgM и IgA. В целом при туберкулезной инфекции отмечаются разноплановые сдвиги синтеза и перераспределения количественного соотношения иммуноглобулинов [Аутеншлюс А. И., 2004; Соболюк Н. В. и соавт., 2011].

Следует отметить, что слаженное функционирование механизмов клеточного и гуморального иммунного ответа на МБТ направлено на ограничение воспалительного очага посредством формирования специфической гранулемы в месте локализации инфектогена.

В клеточный состав гранулемы входят многие клетки, а именно: Т-лимфоциты (преобладают) и В-лимфоциты, макрофаги, которые постепенно трансформируются в гигантские эпителиоидные клетки (Пирогова-Лангханса), нейтрофилы, а также эозинофильные гранулоциты. При этом роль эозинофильных лейкоцитов в патогенезе туберкулезной инфекции в настоящее время не ясна. Многие отечественные исследователи ставят под сомнение участие эозинофилов в развитии туберкулеза, ассоциированного с активацией преимущественно клеточного звена иммунитета. Однако в последние годы произошло значительное расширение представлений о функциональном потенциале эозинофильных гранулоцитов, что позволяет рассматривать эти клетки - ранее не изученные в контексте бактериальной инфекции - в качестве полноценных участников врожденного и адаптивного

иммунного ответа, инициированного МБТ.

#### **1.4. Современные представления о строении и функциональных особенностях эозинофилов в норме и при патологии**

Эозинофилы – это полиморфноядерные лейкоциты, имеющие двухлопастное ядро и большие ацидофильные цитоплазматические гранулы. Гранулы эозинофилов содержат кристаллоидное ядро и матрицу. Эозинофилы выделяют большое количество цитотоксических гранулярных катионных белков (главный основной протеин, эозинофильный катионный протеин, эозинофильную пероксидазу и эозинофильный нейротоксин) [Анаев Э. Х., 2002; Rothenberg M. E. et al., 2007].

Одним из преобладающих катионных белков эозинофилов человека является главный основной протеин (МВР), депонированный в ядре специфических гранул этих клеток. МВР непосредственно изменяет ответ гладких мышц на дизрегуляцию функции мускариновых ( $M_2$  и  $M_3$ ) рецепторов; вызывает дегрануляцию тучных клеток и базофилов. МВР вовлечен также в регуляцию пластичности периферических нервов [Melo R. C. N. et al., 2010]. Нарушение секреции МВР играет важную роль в патогенезе многих заболеваний.

К внутриклеточным протеинам принято относить также эозинофильный нейротоксин (EDN) – белок, обладающий противовирусной активностью (установленной *in vitro* в отношении респираторного синцитиального вируса и ВИЧ) [Lee J. J. et al., 2010]. Кроме того, он усиливает преимущественное накопление и высвобождение провоспалительных цитокинов ДК [Yang D. et al., 2007].

В свою очередь, эозинофильный катионный протеин (ЕСР) реализует свою цитотоксическую функцию в отношении микроорганизмов, включая бактерии, простейшие и гельминты, может способствовать появлению ионселективных «токсичных» пор в мембране клеток-мишеней, способствуя, возможно, проникновению внутрь клетки других цитотоксических молекул [Rothenberg M. E. et al., 2007]. ЕСР имеет ряд дополнительных

нецитотоксических функций: данный протеин активирует пролиферативный ответ Т-лимфоцитов, усиливает синтез иммуноглобулинов В-клетками, а также подавляет дегрануляцию тучных клеток, стимулирует секрецию слизи в воздухоносных путях и образование гликозаминогликанов фибробластами [Blom K. et al., 2012].

Эозинофильная пероксидаза (ЕРО), присутствующая в больших специфических гранулах, обладает бактерицидной активностью. В экспериментах *in vitro* доказано, что пероксидаза эозинофилов оказывает значительное тормозящее действие на многие бактерии, что выражается в повреждении бактериальной стенки и лизисе клетки (как в присутствии перекиси водорода, так и в ее отсутствии) [Li Z. et al., 2009].

Согласно данным литературы, все вышеперечисленные протеины проявляют цитотоксическое действие не только в отношении патогена, но и являются токсичными для «здоровых» тканей, в том числе сердца, головного мозга и бронхиального эпителия [Bischoff S. C. et al., 2006; Fang Y. et al., 2010; Shamri R. et al., 2010].

Помимо катионных белков, гранулы эозинофилов содержат большое разнообразие других биологически активных веществ: гистаминазу, осуществляющую регуляцию уровня гистамина путем его инактивации; лизофосфолипазу, определяющуюся в тканях и жидкостях в местах воспаления, в том числе в кристаллах Шарко–Лейдена; простагландины (P<sub>g</sub>) D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub>, потенцирующие хемотаксис эозинофилов. В эксперименте *in vivo* было показано, что P<sub>g</sub>D<sub>2</sub> обладает способностью индуцировать эозинопению и избирательное накопление эозинофилов в дыхательных путях, стимулируя развитие бронхоконстрикции. В свою очередь, P<sub>g</sub>E<sub>1</sub> и P<sub>g</sub>E<sub>2</sub>, секретируемые эозинофилами, подавляют дегрануляцию тучных клеток и базофилов [Литвинова Л. С. и соавт., 2007].

До недавнего времени эозинофилы принято было считать агрессивными клетками-эффе́кторами, обладающими лишь цитотоксической (за счет веществ, находящихся в гранулах) и фагоцитарной (поглощение



небольших растворимых антигенов, комплекса антиген-антитело, облегчая фагоцитоз) активностью. Однако на сегодняшний день произошло значительное переосмысление существующих представлений о физиологических свойствах этих клеток, что наделяет эозинофилы широким спектром потенциальных возможностей.

Так, существенно расширились представления о рецепторных структурах, экспрессированных на эозинофильных гранулоцитах. К ним относятся рецепторы ко многим цитокинам (IL5R, IL4R, IL13R, GM-CSF, TGF $\beta$ R, IL9R, IL13Raf, CD25, CD 116, CD117, CD119, CD120, CD123 и др.), иммуноглобулинам (FC $\epsilon$ RI, FC $\epsilon$ RII), HLA-DR, HLA I и II, CD4, CD16, CD32, CD33, CD47, CD48, CD50, адгезивные молекулы (CD11a, CD11b, CD11c, CD15, CD18, CD29, CD44, CD49b), рецепторы к комплементу, хемокинам и другим хемотаксическим факторам (LTB $_4$ R, CD35, CD88, CD182, CD183) [Rothenberg M.E. et al., 2007]. Установлено также, что эозинофилы являются источником лигандов для этих рецепторов, что делает возможным существование факта их аутокринной и паракринной регуляции [Spencer L. A. et al., 2009].

Помимо вышеперечисленных рецепторов, впервые показано, что эозинофильные гранулоциты несут на своей поверхности функциональный рецепторный комплекс  $\gamma\delta$ TCR/CD3 с аналогичными (но не идентичными) характеристиками  $\gamma\delta$ TCR у  $\gamma\delta$ T клеток. Предполагается, что данный рецептор способствует эозинофильному ответу, направленному против МБТ, и осуществляет дополнительную связь между лимфоидной и миелоидной клеточными линиями в ходе противотуберкулезного иммунного ответа [Legrand F. et al., 2009].

В литературе появляются отдельные сообщения о возможности реализации антигенпрезентирующей функции эозинофильными клетками. Недавние клинические и экспериментальные исследования показали, что эозинофильные гранулоциты способны осуществлять процессинг и презентацию микробных, вирусных и паразитарных антигенов CD4 $^+$ -T-

клеткам, способствуя тем самым Т-клеточной пролиферации и поляризации иммунного ответа [Campos L. E. M. et al., 2009; Shamri R. et al., 2010]. Установлено, что эозинофильные гранулоциты презентируют на своей поверхности не только МНС II класса, но и костимулирующие лиганды (CD80 и CD86), связанные с презентацией антигена и Т-клеточной активностью. Согласно исследованиям U. Raar et al. [2008], адаптивные антигенпрезентирующие эозинофилы являются результатом эозинофил-зависимой Т-клеточной пролиферации. Добавление антигена в смешанную культуру эозинофилов и Т-клеток способствует повышению пролиферативного ответа Т-лимфоцитов. По мнению N. Tedla et al. [2003], эозинофилы могут усиливать активность других антигенпрезентирующих клеток.

Косвенно модулировать иммунный ответ эозинофильные гранулоциты способны за счет активации или подавления функции дендритных клеток (ДК). При этом ДК и макрофаги способны активировать пролиферацию и хемотаксис эозинофилов, а эозинофилы, напротив, секретируют факторы, являющиеся антагонистами макрофагальной активности [Mori Y. et al., 2009]. Показано, что эозинофильные гранулоциты самостоятельно усиливают иммунный ответ посредством инициации накопления Т-клеток памяти в очаге воспаления. Они активируют также хемотаксис Th1-лимфоцитов за счет секреции хемокинов. Присутствие эозинофилов в лимфатических узлах после провокации аллергеном предполагает, что хемокины, выделяемые эозинофилами, могут усиливать накопление Т-клеток в лимфатических узлах. Эозинофилы также могут активировать Th2-зависимый иммунный ответ через высвобождение липидных медиаторов (лейкотриенов) [Lee J. J. et al., 2010; Blom K. et al., 2012].

Реализация вышеописанного иммунорегуляторного потенциала эозинофильными гранулоцитами возможна благодаря способности этих клеток продуцировать и секретировать широкий спектр цитокинов (IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-16, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF,

TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и др.), которые усиливают пролиферацию, дифференцировку и активность Т-лимфоцитов, вызывая Th1/Th2-поляризацию. Так, высвобождение IL-12, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ , а также экспрессия TLR-7 могут приводить к поляризации иммунного ответа в направлении Th1-пути [Spencer L. A. et al., 2009]. Секреция эозинофилами противовоспалительных цитокинов расширяет представления о потенциальной роли эозинофилов в классическом понимании провоспалительных эффекторных клеток. За счет секреции IL-10 и TGF- $\beta$  эозинофильные гранулоциты могут не только предотвращать поляризацию Th0-лимфоцитов в Th1/Th2-фенотипы, но и участвовать в формировании иммуносупрессии. Эозинофильные гранулоциты могут регулировать также Th1/Th2-баланс посредством наработки особого фермента – индоламин-2,3-диоксигеназы, катализирующего превращение триптофана в кинуренин, который, в свою очередь, усиливает апоптоз Th1-лимфоцитов [Rothenberg M. E. et al., 2007; Yousefi S. et al., 2012].

Многообразие функциональных возможностей эозинофильных гранулоцитов позволяет рассматривать эти уникальные клетки в качестве полноценных участников реализации защитных механизмов при многих заболеваниях.

Общепринятым является представление о значимой роли эозинофильных клеток в развитии аллергических заболеваний и паразитарных инвазий. Так, наблюдаемый при паразитарных заболеваниях рост числа эозинофилов, как правило, способствует элиминации паразитов и является признаком адекватной реакции организма [Shamri R. et al., 2010]. В противоположность этому, при патологиях аллергической природы, в частности при бронхиальной астме, рост числа эозинофилов ассоциируется с обострением заболевания. Наличие этих клеток в легких астматиков связано с повреждением ткани, а их количество коррелирует со степенью поздней астматической реакции [Simon D. et al., 2007]. Выявлена также негативная роль эозинофилов при развитии ряда аутоиммунных заболеваний [Simon D.

et al., 2007; Мордвинов В. А. и соавт., 2009; Marszalek A., Neska-Dluqosz I., 2011].

Менее изучена на сегодняшний день роль эозинофилов при бактериальных инфекциях. С недавнего времени в зарубежной литературе стали появляться сообщения о вовлеченности эозинофильных гранулоцитов в механизмы инфекционного процесса, вызванного МБТ. Установлено, что эозинофилы за счет экспрессии TLR и  $\gamma\delta$ TCR способны связывать небелковые антигены МБТ, выступая в качестве антигенраспознающих клеток на доиммунном этапе воспалительного ответа. В результате такого взаимодействия происходит высвобождение бактерицидных веществ, инициирующих повреждение клеточной стенки и лизис бактерий [Legrand F., 2009]. В гранулах эозинофилов идентифицирован также бактерицидный белок, повышающий проницаемость клеток и способный связываться с бактериальными липополисахаридами, нейтрализуя последние [Criado P. R. et al., 2012; Yousefi S. et al., 2012].

Известно, что количество эозинофилов при туберкулезной инфекции может варьировать от повышенного до анэозинофилии. При этом до конца неизученным остается вопрос о механизмах длительного пребывания эозинофильных клеток в крови при туберкулезе легких.

### **1.5. Механизмы формирования эозинофилии крови при патологии**

Нормальное содержание эозинофильных гранулоцитов в крови составляет 1-5% от общего количества лейкоцитов, что в абсолютных единицах составляет 70-350 эозинофилов в 1 мкл периферической крови.

Эозинофилия - это состояние, при котором отмечается увеличение количества эозинофилов более  $(0,35-0,5) \times 10^9/\text{л}$  или свыше 5% в гемограмме [Rothenberg M. E. et al., 2007; Spencer L. A. et al., 2009]. На сегодняшний день не существует единой классификации эозинофилий, некоторые авторы выделяют умеренную (количество эозинофилов свыше 10-15% в гемограмме) и выраженную (количество эозинофилов свыше 15-20% в гемограмме)

эозинофилию. В пересчете на абсолютные значения: содержание эозинофилов от 500 до 1500 на 1 мкл расценивается как легкая эозинофилия, свыше 1500 клеток в 1 мкл - как гиперэозинофилия: умеренная (1500-5000 клеток/мкл) и выраженная (более 5000 клеток/мкл) [Marchand E. et al., 2006; Takatsu K. et al., 2008; Shamri R. et al., 2010].

В современной литературе все эозинофилии разделяют на реактивные и клональные. Формирование клональной (первичной) эозинофилии обусловлено злокачественной пролиферацией клеток, что характеризуется обнаружением в эозинофилах периферической крови, а также в клетках костного мозга хромосомных или молекулярно-генетических перестроек. Данное обстоятельство доказывает их принадлежность к лейкемическому эозинофильному клону. Первичные эозинофилии служат одним из проявлений опухоли миелоидной ткани и встречаются при хронических гиперэозинофильных лейкозах, остром миеломонобластном лейкозе с inv(16) t(16;16), в редких случаях – при миелодиспластическом синдроме, остром миелоидном лейкозе (ОМЛ), Ph BCR/ABL-позитивном хроническом миелолейкозе (ХМЛ) и других миелопролиферативных заболеваниях [Литвинова Л. С. и соавт., 2007; Михайлова Н. Б., Афанасьев Б. В., 2009; Yousefi S. et al., 2012].

Достаточно обширен нозологический круг реактивной эозинофилии, встречающейся при заболеваниях, имеющих разные механизмы возникновения, клинические проявления, а также прогноз и исход. Известно, что реактивная эозинофилия наиболее часто встречается при аллергических и аутоиммунных расстройствах, гельминтных инвазиях, опухолях различной локализации, а также при заболеваниях желудочно-кишечного тракта [Rothenberg M. E. et al., 2006; Rosenberg H. F. et al., 2009].

90% всех эозинофилий составляют реактивные (неклональные или вторичные, симптоматические), развивающиеся в ответ на повышенную продукцию Т-лимфоцитами хелперами (Th) 2-го типа медиаторов, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов.

Ключевым эозинофилопоэтином считается IL-5, который впервые был выявлен у мышей, как фактор роста и дифференцировки В-лимфоцитов, стимулирующий выделение иммуноглобулинов из плазматических клеток. Дальнейшие исследования показали, что IL-5 стимулирует также выделение иммуноглобулинов и цитокинов, таких как IL-2, IL-4, IL-6, и TGF- $\beta$  из зрелых В-клеток [Morshed M. et al., 2012].

Согласно современным представлениям, IL-5 оказывает физиологически значимые биологические эффекты преимущественно на эозинофильные гранулоциты [Endo Y. et al., 2011; Wolterink R. G. et al., 2012]. IL-5 – гомодимер с молекулярным весом 45-50 кДа, вариабельность его молекулярной массы обусловлена разной степенью гликозилирования белка, синтезируемого различными типами клеток. Пептидная часть одной цепи включает 115 аминокислотных остатков. Мономерная и димерная формы IL-5 обладают сходной функциональной активностью. Изучение полной аминокислотной последовательности IL-5 у мыши и человека выявило высокую степень гомологии, равную 70% [Zaks-Zilberman M. et al., 2008; Kougo T. et al., 2009].

Основными клетками-продуцентами IL-5 являются активированные Th2-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты, НК-клетки, В-лимфоциты, тучные клетки при стимуляции комплексом «аллерген – IgE» и сами эозинофильные гранулоциты после индукции МБТ, *Toxocara Canis* или аллергеном [Johnson V.J. et al., 2008; Wolterink R. G. et al., 2012].

IL-5 избирательно повышает пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественниц эозинофилов в костном мозге, а также стимулирует их выход в периферическую кровь [Zaks-Zilberman M. et al., 2008; Kusano S. et al., 2012]. Ключевая роль IL-5 в образовании и высвобождении эозинофильных лейкоцитов в кровотоке была продемонстрирована во многих экспериментах. Было показано, что у трансгенных мышей повышенная продукция IL-5 являлась причиной возникновения эозинофилии периферической крови, а удаление гена *IL5*, напротив, приводило к

снижению количества эозинофилов в крови и ткани легкого при нагрузке аллергеном [Rothenberg M. E. et al., 2007].

Наряду с усилением эозинофилопоэза, IL-5 индуцирует терминальные стадии созревания эозинофильных гранулоцитов, а также способствует повышению количества эозинофилов в крови и тканях путем ингибирования апоптоза [Johnson V. J. et al., 2008; Takatsu K. et al., 2008; Endo Y. et al., 2011].

IL-5 обладает также хемотаксической активностью по отношению к эозинофилам, увеличивая их адгезию к сосудистому эндотелию; повышает эффекторные функции эозинофильных лейкоцитов, включая генерацию активных форм кислорода и выделение цитотоксических белков гранул [Takatsu K. et al., 2009; Wise E. L. et al., 2010].

Важная роль IL-5 в индукции эозинофилопосредованного воспаления доказана при изучении особенностей патогенеза бронхиальной астмы и аллергических реакций на животных. Так, у IL-5-трансгенных мышей, экспрессирующих IL-5, в эпителии легких зарегистрирована эозинофильная инфильтрация, гиперплазия эпителиальных клеток, эпителиальная гипертрофия и гиперреактивность дыхательных путей. Введение нейтрализующих анти-IL-5-антител или растворимой формы IL-5RA животным данной линии ингибировало гиперэозинофилию, индуцированную введением аллергена, но не влияло на бронхиальную гиперреактивность [Kougo T. et al., 2009; Patino E. et al., 2011]. Установлено, что экспрессия мРНК IL-5 повышается в биоптатах бронхов у больных бронхиальной астмой. Дополнительные ингаляции рекомбинантным человеческим IL-5 у больных бронхиальной астмой приводило к увеличению числа эозинофилов в мокроте, гиперреактивности бронхов и высвобождению ECP [Wolterink R. G. et al., 2012]. Следует отметить, что эозинофильные гранулоциты способны сами секретировать IL-5 и тем самым способствовать выходу дополнительных порций лейкоцитов эозинофильного ряда из костного мозга, их активации и хронизации воспаления [Hong S.-J. et al., 2005].

Реализация всех вышеперечисленных функций IL-5 осуществляется при

связывании со специфическим рецептором (IL-5R), экспрессированным на эозинофильных гранулоцитах [Kabesch M. et al., 2007; Patino E. et al., 2011]. IL-5R относится к семейству цитокиновых рецепторов 1-го типа, которое включает рецепторные структуры для IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, GM-CSF, G-CSF и эритропоэтина.

IL-5R состоит из уникальной  $\alpha$  субъединицы (IL-5Ra/CD125, внеклеточный домен) и  $\beta$ -цепи (bc/CD131), общей с IL-3 и GM-CSF.  $\beta$  субъединица сама по себе не связывает лиганд, ее цитоплазматический домен вовлечен в передачу сигнала внутри клетки и имеет важное значение для увеличения сродства  $\alpha$ -цепи к IL-5. Гомодимерная парная винтовая конфигурация IL-5 дает возможность двухвалентного связывания каждой рецепторной субъединицы [Takatsu K., 2011; Kusano S. et al., 2012].

Связываясь со своим поверхностным рецептором, IL-5 передает внутриклеточный сигнал, который приводит к активации экспрессии определенных генов в ядре, что в конечном итоге вызывает изменение функциональной активности клетки. Для IL-5 идентифицировано несколько основных сигнальных путей, которые также используются для передачи сигнала от IL-3 и GM-CSF. Эти пути относятся к JAK/STAT-, Ras/MAPK- и PI<sub>3</sub>-киназным сигнальным путям. Установлено, что JAK2 ассоциирована с IL-5Ra, в то время как JAK1 связана с  $\beta$ -субъединицей в нестимулированных клетках. После связывания лиганда JAKs активируются трансфосфорилированием друг друга, а затем фосфорилируют несколько остатков тирозина на  $\beta$ -субъединице (Y577, Y612, Y695 и Y750). Далее транскрипционные факторы STATs фосфорилируют тирозин посредством JAK-киназ, перемещаются в ядро, связываются со специфическими последовательностями ДНК и регулируют транскрипцию соответствующих генов [Endo Y. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012]. По мнению J. Wang et al. [2007], JAK/STAT путь имеет важное значение для пролиферации и дифференцировки эозинофильных гранулоцитов.

Наряду с мембран-ассоциированной формой существует растворимый



IL-5Ra (sIL-5Ra), способный конкурировать за связывание с IL-5. Биологическая роль sIL-5Ra до конца не изучена, однако доказана его способность нейтрализовать одноименный медиатор в механизмах ограничения IL-5-опосредованного иммунного ответа [Liu X.-Q. et al., 2008; Wolterink, R. G. et al., 2012].

Еще одним медиатором, регулирующим функциональную активность эозинофильных гранулоцитов, считается эотаксин, впервые идентифицированный в бронхоальвеолярном лаваже аллергизированных морских свинок [Rothenberg M. E. et al., 2007; Manqieri D. et al., 2012]. Семейство эотаксина включает сам эотаксин - белок, состоящий из 73 аминокислот, а также два других хемокина (эотаксин-2 и эотаксин-3), которые обладают функциональной гомологией (менее чем на 40%) с эотаксином [Pease J. E. et al., 2006; Rothenberg M. E. et al., 2007]. Ген эотаксина человека локализован на хромосоме 17q11.2 в кластере CC-хемокинов, в свою очередь гены эотаксина-2 и эотаксина-3 были картированы на хромосоме 7q11.2 [Jean-Baptiste S. et al., 2002; Wise E. L. et al., 2010].

Главными клетками-продуцентами эотаксина являются эпителиальные клетки, гладкомышечные клетки, фибробласты и сами эозинофилы [Papilinska M. et al., 2007; Haley K. J. et al., 2008; Tedeschi A. et al., 2012].

Основная роль эотаксина заключается в потенцировании процессов рециркуляции эозинофилов из кровотока в ткани и наоборот, а также в регуляции процессов хемотаксиса и дегрануляции эозинофильных гранулоцитов. Как индуктор хемотаксиса, эотаксин инициирует полимеризацию внутриклеточного актина, что является необходимым условием для реализации направленного движения клеток в очаг воспаления, и индуцирует продукцию активных форм кислорода, тем самым выступая в роли провоспалительного агента [Dent G. et al., 2004; Lintomen L. et al., 2007; Manqieri D. et al., 2012].

Потенциальными посредниками продукции эотаксина являются

цитокины, синтезируемые Th2-лимфоцитами: IL-4, IL-13 и IL-5. Экспериментальными исследованиями было подтверждено, что накопление эозинофилов в легочной ткани крыс, опосредованное эотаксином, индуцировано внутрикожным введением IL-4. Было показано также, что IL-4 оказывает синергетический эффект с провоспалительным цитокином TNF- $\alpha$ , увеличивая секрецию эотаксина фибробластами легких. Введение анти-IL-4 антител ингибировало экспрессию мРНК эотаксина в легких [Fischer R. et al., 2007; Johnson V. J. et al., 2008; Tedeschi A. et al., 2012].

Более мощным (чем IL-4) индуктором продукции эотаксина эпителиальными клетками ткани легкого в естественных условиях является IL-13, экспрессия которого индуцирует эозинофильную инфильтрацию, а также гиперсекрецию слизи, субэпителиальный фиброз и гиперреактивность бронхов [Palikhe N. S. et al., 2010; Xu Y. Y. et al., 2012]. Это подтверждается результатами ряда авторов, продемонстрировавшими отсутствие гиперреактивности дыхательных путей при введении ингибиторов IL-13 у мышей, несмотря на наличие эозинофилии [Ландышев Ю. С. и соавт., 2008].

На сегодняшний день особый интерес исследователей привлекает изучение кинетики секреции эотаксина и накопления эозинофилов в тканях, рассматриваемой на модели лабораторных животных. После провокации аллергеном у сенсibilизированных морских свинок пик продукции эотаксина в легочной ткани был зарегистрирован в течение первых 6 ч и далее снижался в течение последующих 6-12 ч. При этом появление эозинофильных гранулоцитов в бронхоальвеолярном лаваже происходило значительно позже (через 12-24 ч), что могло быть связано с накоплением эотаксина в просвете дыхательных путей в результате перераспределения хемотаксического градиента. При введении антител к эотаксину у сенсibilизированных морских свинок отмечалось значительное снижение количества эозинофилов в бронхоальвеолярном лаваже [Dolgachev V. et al., 2008; Lewis T. C. et al., 2012].

Изучение тканевой эозинофилии у мышей показало, что эотаксин не

является облигатным фактором трансэндотелиальной миграции эозинофилов в легочную ткань, но может участвовать в трансэпителиальном пути проникновения в просвет дыхательных путей, тогда как присутствие IL-5 способствует доступности периферического пула эозинофилов и выделению других хемотаксических факторов, в том числе эотаксина [Huaux F. et al., 2005; Haley K.J. et al., 2008; Lewis T. C. et al., 2012].

Повышенная экспрессия эотаксина в легочной ткани была выявлена также у больных бронхиальной астмой. Количество клеток, экспрессирующих мРНК эотаксина, в слизистой бронхов у этих пациентов достоверно коррелировало с эозинофилией дыхательных путей, бронхиальной гиперреактивностью и тяжестью клинических симптомов. Увеличение экспрессии мРНК эотаксина и соответствующего белка было зарегистрировано также при хроническом синусите и сезонном аллергическом рините [Huaux F. et al., 2005; DeBrosse C. W. et al., 2008; Lewis T. C. et al., 2012].

Наряду с этим, высокий уровень экспрессии эотаксина и его м-РНК был отмечен в кишечнике при язвенном колите и болезни Крона, что определяет молекулярные механизмы накопления эозинофильных гранулоцитов при этих заболеваниях. Высокий уровень эотаксина прямо коррелирует со степенью эозинофилии крови и тканей также при болезни Ходжкина [Lintomen L. et al., 2007; Ahrens R. et al., 2008; Manousou P. et al., 2010; Zafra M. P. et al., 2012].

Эотаксин оказывает свое действие через специфический рецептор CCR3, который включает семь трансмембранных доменов, связанных с G-белками. CCR3 экспрессирован в основном на эозинофильных гранулоцитах, а также на базофилах, тимоцитах, эндотелиальных клетках и Т-лимфоцитах. Экспрессия CCR3 на Th2-лимфоцитах представляет особый интерес, поскольку эти клетки регулируют накопление эозинофильных гранулоцитов в очаге воспаления. Ген *CCR3* человека находится на хромосоме 3p21 в 285 Kb регионе от генов *CCR1* и *CCR2* [Bullock J.Z. et al., 2007; Miyagaki T. et al.,

2010].

Следует отметить, что помимо IL-5 и эотаксина, действующих через специфические рецепторы, существуют и другие цитокины, опосредующие формирование эозинофилии.

Одним из основных регуляторов пролиферации и дифференцировки эозинофилов на ранних стадиях развития клеток является IL-3 - белок с молекулярным весом 15-17 кДа (133 аминокислоты), устанавливающий связь между иммунной и кроветворной системами. Основными продуцентами IL-3 являются Th1- и Th2-лимфоциты после стимуляции антигенами и митогенами, а также цитотоксические Т-лимфоциты, НК-клетки, тучные клетки, эпителиальные клетки тимуса и моноциты. В некоторых клеточных линиях продукция IL-3 является конститутивной. Известно, что вещества, подавляющие активацию Т-лимфоцитов (глюкокортикоиды или циклоспорин), также подавляют продукцию IL-3 [Murphy J. M. et al., 2008; Cook E. V. et al., 2012].

IL-3 способствует образованию фенотипически различных клеточных линий из ранних предшественников всех гемопоэтических ростков дифференцировки: лимфоидного, моноцитарного, гранулоцитарного, мегакариоцитарного и эритроидного. Кроме того, он стимулирует рост негемопоэтических стромальных клеток костного мозга, способствует повышению экспрессии рецепторов для колониестимулирующего фактора (CSF) [Chen J. et al., 2009]. В определенных концентрациях IL-3 является хематтрактантом для эозинофилов, а также влияет на поведение этих клеток в ответ на другие хемотаксически активные факторы. Известна его способность усиливать синтез гистамина тучными клетками и активировать фагоцитарную активность макрофагов [Murphy J. M. et al., 2008; Mirza S. et al., 2010].

Свое действие IL-3 оказывает через специфический рецептор, экспрессированный на макрофагах, базофилах, тучных клетках, эозинофилах, мегакариоцитах и клетках-предшественницах в костном мозге. Связывание

IL-3 с рецептором приводит к фосфорилированию последнего и цитоплазматических белков (p70, p56, p38) и, в конечном счете, к активации протеинкиназы C [Zafra M. P. et al., 2012].

Ген *IL3* имеет длину около 2,2 кб и состоит из пяти экзонов. Ген картирован на человеческой хромосоме 5q23-31 и расположен в непосредственной близости от других генов цитокинов, в том числе тех, которые кодируют IL-5 и GM-CSF. Расстояние между генами *IL3* и *GMCSF* около 9 кб [Kabesch M. et al., 2007].

В качестве регулятора пролиферации и дифференцировки клеток-предшественниц моно- и полинуклеарных фагоцитов, в частности эозинофилов, выступает также GM-CSF.

GM-CSF является мономерным белком, состоящим из 127 аминокислот с двумя сайтами гликозилирования. Белок синтезируется в виде предшественника из 144 аминокислот, в которые включены гидрофобные секреторные сигнальные последовательности на аминотерминальном конце. Различный молекулярный вес GM-CSF (14 кДа и 35 кДа), описанный в литературе, является результатом определенной степени гликозилирования. GM-CSF может быть связан с внеклеточным матриксом клетки в виде комплекса с протеогликаном гепарансульфатом. Это позволяет сохранять фактор в биологически неактивной форме. Однако установлено, что мембраносвязанная или матриксосвязанная формы GM-CSF могут взаимодействовать с рецепторами близлежащих клеток [Mori Y. et al., 2009; Mirza S. et al., 2010].

Основными клетками-продуцентами GM-CSF являются Т-лимфоциты, активированные макрофаги и др. Синтез этого медиатора эндотелиальными клетками и фибробластами является индуцибельным, другие типы клеток синтезируют GM-CSF конститутивно [Murphy J. M. et al., 2008; Cook E. B. et al., 2012].

Помимо активации клеток-предшественниц GM-CSF стимулирует зрелые формы клеток, увеличивая экспрессию молекул адгезии (CD11a и

CD11b) на их поверхности, что может быть одной из причин местного накопления гранулоцитов в очаге воспаления [Ishino T. et al., 2008; Greter, M. et al., 2012]. GM-CSF повышает также экспрессию рецепторов для FMLP (стимулятор активности нейтрофилов), усиливает микробицидные свойства, окислительный метаболизм и фагоцитарную активность нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов [Murphy J. M. et al., 2006]. В пико- и наномолярных концентрациях GM-CSF усиливает хемотаксис эозинофилов, а также оказывает влияние на хемотаксическое поведение этих клеток в ответ на другие факторы хемотаксиса. В гранулоцитах GM-CSF стимулирует высвобождение метаболитов арахидоновой кислоты и увеличивает выработку активных форм кислорода [Ishino T. et al., 2008; Hercus T. R. et al., 2012].

Ген *GMCSF* имеет длину около 2,5 кб и состоит из четырех экзонов. Человеческий ген *GMCSF* картирован на хромосоме 5q22-31 в непосредственной близости от других генов, кодирующих гемопоэтические факторы роста (M-CSF, IL-3, IL-4 и IL5) [Kabesch M. et al., 2007].

Количество рецепторов к GM-CSF на клетках миелоидного ряда составляет от нескольких сотен до нескольких тысяч на клетку. Рецепторы к GM-CSF экспрессированы также на негемопоэтических клетках, таких как эндотелиальные клетки и мелкие клетки карциномы легких [Greter M. et al., 2012].

Изучая ключевые факторы, обуславливающие развитие эозинофилии при патологии, необходимо учитывать то, что продукция медиаторов, выделяемых клетками, 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 той или иной патологии [Герцог О. А. и соавт., 2005].

## **1.6. Структурные основы функционального полиморфизма генов цитокинов**

В результате проведения программы «Геном человека» удалось полностью расшифровать нуклеотидную последовательность ДНК. При этом оказалось, что гены разных людей при почти полной идентичности, тем не менее, не абсолютно одинаковы. Наиболее частой причиной различий в структуре генов являются точечные мутации – замены единичных нуклеотидов или так называемый полиморфизм единичных нуклеотидов (SNP - single-nucleotide polymorphism). Большинство выявляемых SNP-замен чаще затрагивают 5'- либо 3'-концевые регуляторные участки генов, например область промотора, или располагаются в некодирующих областях (интронах) и не отражаются на аминокислотной последовательности транслируемого белка. Однако часть из них может влиять на скорость транскрипции генов, стабильность мРНК и тем самым приводить к увеличению или уменьшению количества и уровня биологической активности синтезируемого пептида. Это явление получило название «функционального аллельного полиморфизма гена» [Симбирцев А. С., Громова А. Ю., 2005; Абрамов Д. Д. и соавт., 2011].

Из клинических наблюдений известно, что реализация воспалительного ответа может существенно различаться по интенсивности и продолжительности: у одних больных он протекает более остро, агрессивно и сопровождается высокими значениями лихорадки, у других имеет затяжной характер. Анализ генетических основ, обуславливающих индивидуальные реакции организма, задача сложная, связанная прежде всего с тем, что генетическая предрасположенность определяет развитие заболеваний только на 20-40%, а 60-80% обусловлены фенотипическими особенностями. Поэтому поиск генетических маркеров, контролирующих ключевые звенья патогенеза инфекционных болезней, несомненно, является одной из актуальных и перспективных задач медицинской генетики. Это тем более важно, что определенную трудность для клиницистов представляет

мультифакторный характер инициации поражения легочной системы, поскольку единичный фактор не может раскрыть сложного каскада патогенетических механизмов инфекционных заболеваний. Менее изученным патогенетическим звеном при воспалительной патологии вообще и бронхолегочной системы в частности остается исследование по выявлению ассоциации полиморфных локусов генов - кандидатов с риском развития заболеваний легких [Кононенко В. И. и соавт., 2006; Pullat J. et al., 2007].

Различия в генах, контролирующих защитные реакции организма, могут определять различный характер протекания воспалительного ответа и специфических иммунологических реакций при внедрении патогенов. В первую очередь это касается генов регуляторных молекул, обеспечивающих начальные этапы развития воспалительной реакции: распознавание патогена, проведение внутриклеточного активационного сигнала и синтез медиаторов развития воспалительной реакции, в состав которых входят и цитокины [Громова А. Ю., Симбирцев А. С., 2005; Онищенко Г. Г. и соавт., 2008].

Анализ данных литературы показывает что, по всей видимости, степень дисрегуляции воспалительного ответа вследствие полиморфизма генов цитокинов с возрастом может увеличиваться и по-разному проявляться в течение жизни. Кроме того, ряд гнойно-воспалительных патологий в острой фазе ассоциируются с высокопродуцирующими аллелями генов провоспалительных цитокинов, а в хронической – генов противовоспалительных цитокинов [Герцог О. А. и соавт., 2005; Абрамов Д. Д. и соавт., 2011].

Большое внимание уделяется изучению расовых различий в аллельной ассоциации генов цитокинов. Выявлено, что принадлежность к разным расам и даже проживание на разных территориях оказывает существенное влияние на характер их распределения. Однако данные, демонстрирующие эти различия, пока немногочисленны, так как требуют проведения генетического скрининга больших групп населения. По всей видимости, исследования в данном направлении в конечном итоге позволят понять историю



возникновения и распределения различных аллелей генов [Громова А. Ю., Симбирцев А. С., 2005].

Генетическое тестирование полиморфизма генов предрасположенности к различным мультифакториальным болезням в России еще только начинается и пока сосредоточено лишь в единичных лабораториях Санкт-Петербурга, Москвы, Уфы, Томска, Новосибирска и Казани. Между тем, тестирование аллельных вариантов гена предрасположенности дает не только важную информацию о состоянии систем организма, но и позволяет оценить предрасположенность пациента сразу к нескольким различным, зачастую патогенетически далеко отстоящим друг от друга заболеваниям. Важно подчеркнуть, что само наличие неблагоприятного аллеля не позволяет судить ни о времени начала заболевания, ни о его тяжести. Нельзя утверждать, что обследуемый доброволец наверняка заболеет именно этой болезнью. Генетическое тестирование позволяет в досимптомный период выявить существующие пока только в геноме наследственные тенденции к развитию болезней и наметить пути их ранней профилактики [Ризванова Ф. Ф. и соавт., 2010].

### **1.7. Связь аллельного полиморфизма генов цитокинов с формированием эозинофилии при заболеваниях**

В последние годы выполнено большое число работ, выявивших ассоциации между вариантами аллелей генов регуляторных молекул, реализующих свою активность на различных этапах воспаления, уровнями экспрессии этих генов, характером продукции соответствующих белков и предрасположенностью к тем или иным заболеваниям [Johnson V. J. et al., 2004; Симбирцев А. С., Громова А. Ю., 2005].

На сегодняшний день в разных популяциях мира показаны ассоциации ТЛ более чем с 20 генами: *HLA-DQ/DR* (лейкоцитарные антигены II класса), *VDR* (рецептор к витамину D), *IFNG*, *SLC11A1* (*NRAMP1*, катионный транспортер), *IL10*, *TAP* (транспортер, ассоциированный с процессингом

антигенов), *TLR2*, *TNFA*, *IL8*, *MBL* (маннозо-связывающий лектин), *IL1RA* (рецепторный антагонист IL-1), *IL1B*, *IL12RB1*, *IL12B* (p40 субъединица IL-12), *CYP2E1* (цитохром P450) и другими [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]. Начаты активные исследования по нахождению связи ТЛ с полиморфизмами генов, кодирующих цитокины гуморального пути иммунного ответа [Ridruechai C. et al., 2010].

В современной литературе представлены данные о полиморфизме генов многих цитокинов и их рецепторов, в частности тех, которые участвуют в формировании эозинофилии периферической крови при различных заболеваниях.

Ключевыми медиаторами, оказывающими свое влияние на эозинофильные гранулоциты, являются IL-5 и эотаксин. Логично предположить, что формирование эозинофильной реакции крови при ТЛ может иметь генетическую природу и обеспечиваться единичными заменами нуклеотидов в промоторной области генов *IL5* и *эотаксина*, а также рецепторов к ним: *IL5RA* и *CCR3*.

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

Особенно активно полиморфизм гена *IL5* изучается при различных аллергических заболеваниях. Так, М. Б. Фрейдиным и соавт. [2002] установлено, что функциональный полиморфизм *C-703T* гена *IL5* ассоциирован с бронхиальной астмой и количеством эозинофилов в периферической крови. J. D. Rioux et al. [1998] установили, что аллель *C* и генотип *CC* полиморфизма *C-703 T* гена *IL5* чаще встречался у больных семейной гиперэозинофилией. В свою очередь, А. В. Карповой [2009] было

установлено, что одним из факторов риска развития атопического дерматита напротив является наличие аллеля *T* и генотипа *TT* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5*. Большинство данных свидетельствует о том, что многие полиморфные варианты гена *IL5* и его рецептора обуславливают общую подверженность к атопии. По данным И.С. Поповой и соавт. [2010], аллель *C* полиморфизма *C-703* гена *IL5* важен для реализации воспалительного ответа при бронхиальной астме. N. Yamamoto et al. [2003] выяснили также, что данный полиморфизм ассоциирован с высоким уровнем эозинофилов периферической крови при атопическом дерматите в японской популяции. Указывая на важную роль *IL-5* в патогенезе атопического дерматита, исследователи установили ассоциацию полиморфизма *-4597 T/A* гена *IL5* с сывороточным уровнем *IgE*, *ЕСР*, а также эозинофилией крови при данном заболевании. Другой группой ученых были продолжены эти исследования в корейской популяции [Namkung J.-H. et al., 2007]. Установлено, что полиморфизм *-4597 T/A* гена *IL5* ассоциирован с атопическим дерматитом, однако достоверной связи аллелей *T* и *A* данного полиморфного сайта с концентрацией *IL-5* в крови найдено не было.

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 имеет протективный эффект в отношении бронхиальной астмы [Kabesch M. et al., 2007]. Также установлено, что данный полиморфизм ассоциирован со сниженными спирометрическими показателями: объемом форсированного выдоха (*ОФВ*) и форсированной жизненной емкостью легких (*ФЖЕЛ*) при бронхиальной астме у детей в корейской популяции [Hong S.-J. et al., 2005] и высоким уровнем эозинофилов в периферической крови при атопическом 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 встречается 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 с другими заболеваниями инфекционной и неинфекционной природы. Так, 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 Е. В. 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/м<sup>2</sup>.

Особый интерес представляет изучение гена рецептора к IL-5 (*IL5RA*). 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 [Sehmi R., 1997; Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J.H. et al., 2007]. Однако группой исследователей во главе с S. Hoffjan [2004], занимающихся изучением 61 полиморфизма 35 генов у больных бронхиальной астмой, не было 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 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 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 другими кандидатами, ответственными за развитие эозинофильной реакции крови, являются эотаксин и его рецептор. В локусе гена *эотаксина* обнаружены по меньшей мере 6 полиморфных сайтов в промоторной области (нуклеотидные позиции: -1328, -426, -384, -329, -67, +123). Все эти полиморфизмы представляют миссенс-мутации (SNP). В процессе многочисленных исследований по выявлению возможных ассоциаций с генетической вариабельностью эотаксина установлено, что

функционально значимый полиморфизм гена этого медиатора регистрируется только для трех полиморфных участков: -1328, -426, -384 в его промоторной области. T.-N. Wang et al. [2007, 2010] показали, что полиморфизм данного гена в положении -384 ассоциирован с высокой концентрацией эотаксина и уровнем общего IgE в крови при атопии. Однако связь вышеназванного полиморфизма с атопической бронхиальной астмой в тайваньской популяции ученым доказать не удалось. В свою очередь, K.A. 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 *эотаксина* 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 *эотаксина* ассоциированы с низким содержанием IgE в крови больных атопическим дерматитом; связи вышеописанных полиморфизмов с уровнем эозинофилов в периферической крови при данном заболевании учеными установлено не было.

Изучение у больных бронхиальной астмой другого полиморфизма гена *эотаксина* Y. Nakamura et al. [2005] позволило констатировать, что генотип *AA* и аллель *A* полиморфного сайта в положении -67 ассоциированы с более низкой концентрацией эотаксина, а также низким количеством эозинофилов в периферической крови. Данной группой исследователей было показано также, что генотип *AA* имеет протективную роль при бронхиальной астме [Tsunemi Y. et al., 2002]. Другой независимой группой исследователей, изучавшей полиморфизмы семейства *эотаксина* 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].

Полиморфизм гена *эотаксина* 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 был отмечен более низкий уровень эотаксина в плазме у больных раком толстой кишки.

В гене рецептора эотаксина *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 полиморфизмов -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*) у больных бронхиальной астмой ассоциировано с низким количеством эозинофилов в периферической крови.

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 было установлено достоверной ассоциации полиморфизма в положении -51 гена *CCR3* с развитием атопического дерматита в японской популяции.

Таким образом, генетически запрограммированный высокий уровень цитокинов и избыточная экспрессия рецепторов, ответственных за развитие эозинофильных гранулоцитов, может обуславливать формирование

эозинофилии при патологии, в том числе при ТЛ. Изучение распределения аллельных вариантов промоторных регионов *C-703T* гена *IL5*, *G-80A* гена *IL5RA*, *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3* среди больных ТЛ представляется весьма актуальным, поскольку позволит идентифицировать генетические маркеры предрасположенности к развитию эозинофилии периферической крови при туберкулезной инфекции. Целесообразность углубленного изучения молекулярно-генетических механизмов эозинофилии крови при туберкулезе легких обусловлена перспективностью использования данной гематологической реакции в качестве дополнительного прогностического критерия течения и прогноза туберкулезного процесса.



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

Диагноз ТЛ устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования легких, данных 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 МБТ и определения чувствительности к противотуберкулезным химиопрепаратам (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 – канд. мед. наук Г.В. Янова) и Томского областного противотуберкулезного диспансера (гл. врач – С.П. Мишустин).

Для решения поставленных задач были сформированы две основные группы исследования в зависимости количества эозинофилов в периферической крови. Первую группу составили 102 пациента с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, во вторую группу вошли 115 больных туберкулезом легких без эозинофилии. Внутри каждой группы были сформированы подгруппы больных с инфильтративным (146

человек) и диссеминированным (71 человек) туберкулезом легких. Оценка ассоциаций носительства отдельных полиморфизмов генов с изменением продукции цитокинов и экспрессии рецепторов на мембране клеток *in vitro* проводилась на примере двух общих групп больных туберкулезом легких с эозинофилией и без эозинофилии.

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

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

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

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

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

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

токсокар и эхинококков в крови не было выявлено.

## **2.2. Материал исследования**

Материалом исследования служила периферическая венозная кровь больных ТЛ и здоровых доноров. Забор крови проводили 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**

### **2.3.1 Определение общего количества лейкоцитов в периферической крови**

Определение общего количества лейкоцитов проводили стандартным методом [Меньшиков В.В., 1999].

*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., 1999].

*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 периферической 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 плотности Percoll ( $\rho=1,133$  г/л) («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 г/л) (табл.1).

*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 ( $\rho=1,081$ ) 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., 1987]. При использовании градиента указанной плотности 87 % выделенных лейкоцитов составляли эозинофильные гранулоциты.

Таблица 1

## Приготовление градиентов Percoll разной плотности

Требуемая плотность Percoll, г/л	Раствор Percoll ( $\rho_0=1,133$ г/л), 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  $1 \times 10^6$ /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°C и 5 % CO<sub>2</sub> 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 VCG в дозе 20 мкг/мл (ФГУП «НПО Микроген»). Клеточные суспензии в количестве 1 мл инкубировали при 37°C и 5 % CO<sub>2</sub> 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. Определение содержания цитокинов в крови и супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов**

Для определения уровня IL-5 в супернатантах культуральных суспензий, а также содержания IL-5, IFN- $\gamma$  и эотаксина в крови 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 (ООО «Протеиновый контур», Россия) и зарубежными («Biosource», США) производителями тест-систем. Для этого микропипеткой добавляли по 100 мкл «0 дозы» и стандартов № 0-4 для исследуемых цитокинов в соответствующие ячейки. В оставшиеся ячейки помещали 100 мкл супернатанта и 25 мкл поликлональных антител и инкубировали планшет при 37°C необходимое по методике время. После двукратного цикла промывки автоматическим вошером в каждую ячейку добавляли по 50 мкл конъюгата пероксидазы хрена и инкубировали необходимое по методике время. После очередного цикла промывок в лунки вводили 200 мкл окрашивающего раствора. Завершающая фаза инкубации заканчивалась добавлением в ячейки стоп-раствора (0,5 М серная кислота). 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.

### **2.3.5. Определение мембраносвязанных форм цитокиновых рецепторов на эозинофильных гранулоцитах крови**

Для определения уровня экспрессии рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксину (CCR3) в интактной и стимулированной в условиях инкубации с рекомбинантным (r) белком (rIL-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 (IL-5RA и CCR3) проводили согласно протоколам фирм-производителей («R&D Systems», США и «Caltag Laboratories», США).

*Ход работы.* После культивирования клетки дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (РН=7,4). Для определения уровня экспрессии рецепторов 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°C. 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°C в темном месте. Дважды отмывали фосфатно-солевым буфером (РН=7,4), ресуспендировали клетки в 400 мкл буфера.

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

Анализ образцов клеточных суспензий проводили по трем параметрам: прямому светорассеянию (FSC), характеризующему размер клетки, боковому светорассеянию (FSC), характеризующему цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и показателю флуоресценции – зеленой (FITC – 530 нм), выявляемых на FL1, FL2, FL3-каналах (рис. 1).

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



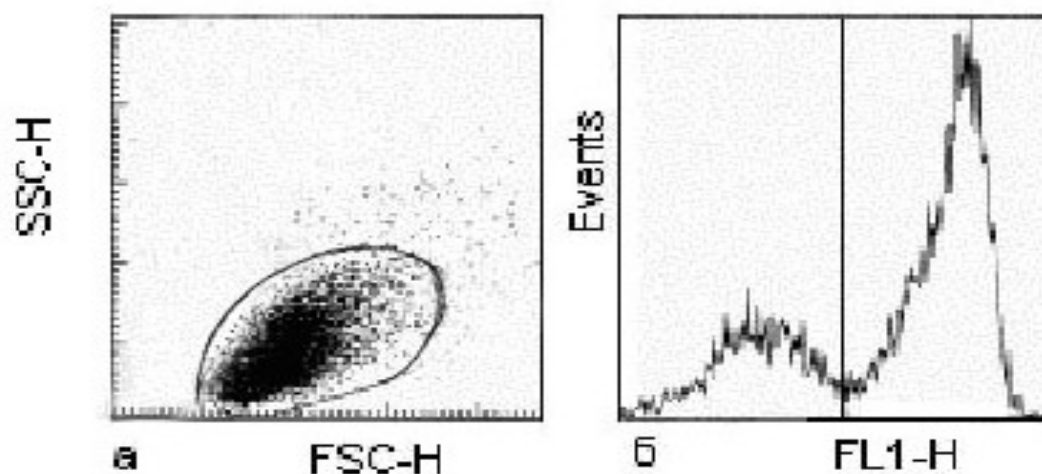


Рис. 1. Гистограмма распределения эозинофилов по интенсивности флуоресценции в FL1-канале. Оценивается содержание IL-5R<sup>+</sup> клеток, меченных FITC, в гейте эозинофильных гранулоцитов:

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).

### 2.3.6. 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 сорбируется на сорбент, затем отмывается буферным раствором и сорбент удаляется. Полученная ДНК используется для дальнейших исследований.

*Ход работы.* Для этого перед началом работы лизирующий раствор и раствор для отмывки №1 прогревали при 65°C 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°C. 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 65°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента, после чего в пробирки добавляли по 50 мкл TE-буфера для элюции ДНК, перемешивали на вортексе и ставили в термостат 65°C на 5 мин, периодически встряхивая на вортексе. Центрифугировали пробирки на микроцентрифуге при 12000 об/мин в течение 1 мин. Полученный супернатант содержал очищенную ДНК.

### **2.3.7. 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 используется специфическая эндонуклеаза рестрикции. По наличию или отсутствию рестрикции делают заключение о характере полиморфизма.

*Ход работы.* Амплификацию осуществляли согласно инструкции, прилагаемой к набору «АмплиСенс PCR» («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°C в течение 7 мин с последующими 30-35 циклами отжига при специфической для каждой пары праймеров температуре (35 с), элонгацию цепи при 72°C (35 с) и денатурацию при 94°C (35 с). Программу завершала финальная элонгация при 72°C в течение 3 мин. Амплификат подвергали гидролизу соответствующей рестриктазой при оптимальной для фермента температуре в течение 12 часов (табл. 2).

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  $H_2O$ , pH=8,0) и нагревали в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. Охлаждали раствор до 50-60°C 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.

## Характеристика исследованных полиморфизмов генов

Ген, полиморфный сайт	Структура праймеров 5'→3'	Температура отжига праймеров (°C)	Фермент рестрикции	Ссылка
<i>IL-5</i> C-703T	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-80A	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> A-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> T-51C	F : ctt-tgg-tac-cac-atc-cta-cca R : tga-gag-gag-ctt-aca-cat-gc	55	<i>Nla III</i>	Fukunaga K., 2001

После проведения ПДРФ-анализа 5 мкл продукта рестрикции разделяли на агарозном геле, содержащем 0,5 мг/мл этидиум бромид, 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).

### 2.3.8. Определение CD3<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови

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

*Принцип метода* состоит в двухстадийной процедуре окрашивания антигенположительных клеток. На первой стадии происходит специфическое связывание моноклональных антител с соответствующими поверхностными антигенами клеток периферической крови. Вторая стадия – «проявление» реакции: в лимфоцитах, нагруженных моноклональными антителами, под действием сублитической концентрации сыворотки кролика, содержащей белки системы комплемента, образуются поры, через которые проникает 0,2% раствор эозина, окрашивая антигенположительные лимфоциты в

розовый цвет. Регистрация результатов производится визуально методом световой микроскопии.

*Ход работы.* Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) наслаивали на градиент плотности фиколл-урографина ( $\rho=1,077 \text{ кг/м}^3$ ) («Медбиоспектр», Москва) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо из лимфоцитарных клеток осторожно, через верхний слой плазмы собирали пипеткой, дважды отмывали раствором Хенкса, сливали надосадочную жидкость, ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 об/мин. В пробирки вносили по 40 мкл клеточной суспензии, предварительно стандартизовав количество клеток до  $2,5 \times 10^6$ /мл, и 5 мкл моноклональных антител, инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. Далее пробирки центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин. Надосадов в количестве 40 мкл сливали. К осадку добавляли 25 мкл сыворотки кролика, содержащей комплемент, инкубировали в течение 90 мин при комнатной температуре. Далее вносили 0,2 % раствор эозина и подсчитывали 100 лимфоцитов, дифференцируя среди них окрашенные.

Результаты выражали в процентах (к 100 подсчитанным клеткам) и абсолютных числах (от общего количества лимфоцитов в крови,  $\times 10^9$ /л).

#### **2.4. Статистический анализ результатов исследования**

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0.

Проверку нормальности распределения количественных показателей проводили с применением критерия Шапиро-Уилка  $W$ . Для нормально распределенных выборок вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое  $\bar{X}$ , среднее квадратичное отклонение  $\sigma$ , ошибка среднего  $m$ . Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану ( $Me$ ), первый ( $Q_1$ ) и третий ( $Q_3$ )

квартили.

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. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости  $p \leq 0,05$ . С целью выявления взаимосвязей между изучаемыми показателями применяли корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) [Боровиков В. В., 2001].

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

$$OR=(A \times D)/(B \times C) \quad (3),$$

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

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

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

Д – 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**

### **3.1. Количественные показатели лейкоцитарного звена у больных туберкулезом легких**

В рамках запланированного исследования все обследованные пациенты с туберкулезом легких (ТЛ) были разделены на две группы в зависимости от количества эозинофилов в периферической крови. Первую группу исследования составили больные инфильтративным туберкулезом легких (ИТЛ) и диссеминированным туберкулезом легких (ДТЛ), сопровождающимся эозинофилией, у которых абсолютное содержание эозинофилов в крови оказалось равным  $(0,791 \pm 0,120) \times 10^9/\text{л}$  ( $p_1 < 0,05$ ) и  $(1,140 \pm 0,011) \times 10^9/\text{л}$  ( $p_1 < 0,05$ ) соответственно, что достоверно превышало контрольные значения –  $(0,196 \pm 0,010) \times 10^9/\text{л}$ . При этом 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 ИТЛ,  $p_1, p_3 < 0,05$ ). Во вторую группу исследования были включены пациенты с ИТЛ и ДТЛ, в крови которых абсолютное количество эозинофилов не превышало нормальных величин (табл. 3).

При исследовании количественных показателей лейкоцитарного звена у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой было показано повышение общего количества лейкоцитов по сравнению с таковым у здоровых доноров как при ИТЛ, так и при ДТЛ (табл. 3).

### **3.2. Содержание IL-5 и эотаксина в крови у больных туберкулезом легких**

При анализе содержания IL-5 в крови у пациентов с ТЛ нами было установлено увеличение данного показателя у больных как ИТЛ, так и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией. При этом уровень IL-5 в крови у больных ИТЛ оказался повышенным в 6,6 раза, а у больных ДТЛ - в 8 раз 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. 4).

Таблица 3

Общее количество лейкоцитов и содержание эозинофильных гранулоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких ( $\bar{X} \pm m$ )

Группы обследованных лиц		Общее количество лейкоцитов, ( $\times 10^9/\text{л}$ )	Содержание эозинофилов	
			%	$\times 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры		5,610 $\pm$ 0,351	3,530 $\pm$ 1,300	0,196 $\pm$ 0,010
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	9,940 $\pm$ 0,560 $p_1 < 0,05$	7,960 $\pm$ 0,380 $p_1 < 0,05$	0,791 $\pm$ 0,120 $p_1 < 0,05$
	Диссеминированный	11,660 $\pm$ 0,490 $p_1 < 0,05$	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	9,83 $\pm$ 1,52 $p_1 < 0,05$	3,000 $\pm$ 1,050 $p_2 < 0,05$	0,294 $\pm$ 0,010 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	10,26 $\pm$ 0,56 $p_1 < 0,05$	2,167 $\pm$ 1,618 $p_2 < 0,05$	0,222 $\pm$ 0,001 $p_2 < 0,05$

*Примечание. Здесь и в табл. 4:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – у пациентов с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией;  $p_3$  – у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких.*

При сравнении уровня ИЛ-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 4,9 раза превышала аналогичный параметр у больных ИТЛ без эозинофилии. При этом у больных ДТЛ, ассоциированном с эозинофильной реакцией крови, концентрация ИЛ-5 оказалась в 7,8 раза соответственно выше аналогичного показателя у больных ДТЛ без таковой (табл. 4).



Содержание ИЛ-5 и эотаксина в крови (пг/мл)  
у больных туберкулезом легких (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы обследованных лиц		ИЛ-5	Эотаксин
Здоровые доноры		7,99 (7,56-19,44)	25,19 (18,27-34,31)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	52,96 (35,65-64,81) p <sub>1</sub> <0,05	42,52 (26,09-51,38) p <sub>1</sub> <0,05
	Диссеминированный	64,02 (38,09-75,18) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	51,08 (41,78-56,49) p <sub>1</sub> <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	10,80 (8,64-36,73) p <sub>2</sub> <0,05	28,21 (25,37-37,96) p <sub>2</sub> <0,05
	Диссеминированный	8,22 (7,31-10,81) p <sub>2</sub> <0,05	39,56 (29,45-48,51) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05

В ходе настоящего исследования нами также было зарегистрировано достоверное повышение уровня эотаксина в крови у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией (в 1,7 и 2,0 раза соответственно), а также у пациентов с ДТЛ без эозинофилии (в 1,6 раза) по сравнению с группой здоровых доноров. Статистически значимое увеличение уровня данного медиатора в крови отмечалось у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с таковым у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии (в 1,5 и 1,3 раза соответственно) (табл. 4).

### 3.3. Содержание ИЛ-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких

Изучение содержания ИЛ-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов с помощью иммуноферментного анализа позволило выявить неоднозначные изменения (табл. 5).

Содержание ИЛ-5 в супернатантах культуральных суспензий эозинофильных гранулоцитов (пг/мл) у больных туберкулезом легких (Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы обследованных лиц		ИЛ-5	
		Интактная	BCG-индуцированная
Здоровые доноры		6,225 (3,131-10,753)	9,157 (4,510-12,618) $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	15,617 (14,696-19,080) $p_1 < 0,05$	28,273 (26,834-31,081) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	14,565 (11,673-17,345) $p_1 < 0,05$	27,589 (24,736-28,604) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	4,169 (1,319-4,809) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	3,928 (1,612-5,457) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	Диссеминированный	4,993 (2,522-5,537) $p_2 < 0,05$	4,501 (2,136-5,457) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 6,7:  $p_1$  – 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.

Спонтанная секреция данного цитокина *in vitro* у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией достоверно превышала аналогичные параметры у здоровых доноров. При добавлении вакцинного штамма BCG в культуры клеток у больных ТЛ с эозинофилией вне зависимости от формы заболевания секреция ИЛ-5 была также выше нормы (табл. 5).

У больных ИТЛ, не сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, напротив, было зарегистрировано снижение спонтанной и BCG-индуцированной секреции ИЛ-5 относительно контрольных значений. При

этом у пациентов с ДТЛ без эозинофилии индуцированная продукция IL-5 оказалась в 2,0 раза ниже, чем у здоровых доноров, тогда как базальная продукция данного цитокина статистически значимо не отличалась от нормального уровня (табл. 5).

Анализ соотношения показателей индуцибельной и спонтанной секреции IL-5 внутри каждой группы обследованных лиц позволил констатировать ее увеличение (в 1,5 раза) в контрольной группе, при этом у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией отмечался более высокий прирост уровня продукции данного медиатора в сравнении с его базальной секрецией относительно нормы. У больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии стимуляция вакцинным штаммом VCG не влияла на уровень продукции IL-5, отмечалась тенденция к снижению индуцированной секреции этого цитокина у пациентов данных групп относительно нормы (табл. 5).

Таким образом, в результате проведенного нами исследования у пациентов с ТЛ, сопровождавшимся эозинофильной реакцией крови, выявлен существенный дисбаланс в секреции ключевых медиаторов, принимающих участие в регуляции функций эозинофильных гранулоцитов. У больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией установлены высокие концентрации IL-5 и эотаксина в крови. Высокий уровень эотаксина в крови, зарегистрированный при ДТЛ без эозинофилии, подтверждает дуализм свойств данного медиатора. Анализ способности эозинофильных гранулоцитов самостоятельно секретировать IL-5 показал, что изучаемые клетки обладают высокой резервной реактивностью в отношении образования эозинофилактивирующих медиаторов.

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

Исследование способности эозинофильных гранулоцитов экспрессировать рецептор к IL-5 (IL-5RA) позволило констатировать достоверное увеличение абсолютного содержания IL-5RA-позитивных эозинофилов в интактной культуре клеток *in vitro* у больных ИТЛ и ДТЛ с

эозинофилией по сравнению с таковым у здоровых доноров ( $0,052 (0,023-0,069) \times 10^6/\text{л}$ ) (табл. 6). Увеличение данного показателя в 1,6 раза выявлялось также у больных ДТЛ без эозинофилии. При сравнении относительного содержания IL-5RA-экспрессирующих эозинофилов в интактной культуре клеток *in vitro* у больных ТЛ регистрировались аналогичные изменения (табл. 6).

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 относительного и абсолютного их числа при ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с таковыми у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 6).

Наряду с изучением базального уровня экспрессии IL-5RA на мембране эозинофильных гранулоцитов, отражающего фоновую активность клеток, в ходе настоящего исследования была оценена способность эозинофилов к рецепторной экспрессии при добавлении *in vitro* экзогенного рекомбинантного IL-5 (rIL-5) (табл. 6).

В результате данного исследования было установлено достоверное повышение абсолютного числа IL-5RA-позитивных эозинофилов у больных ТЛ как с эозинофилией, так и без таковой по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров. Однако 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 раза соответственно превышало аналогичные параметры у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии (табл. 6).

Анализируя соотношение числа эозинофилов, несущих IL-5RA, в условиях инкубации с rIL-5 к таковому в интактной культуре клеток (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.

Таблица 6

Содержание IL-5RA-позитивных клеток в *in vitro* культуре эозинофилов крови у больных туберкулезом легких (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы обследованных лиц		IL-5RA-позитивные эозинофилы		
			Интактная культура	С рекомбинантным IL-5
Здоровые доноры		%	5,16 (3,7-6,45)	7,60 (5,91-11,78) $p_4 < 0,05$
		$\times 10^6$	0,052 (0,023-0,069)	0,076 (0,054-0,088)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инfiltrативный	%	20,86 (16,20-23,35) $p_1 < 0,05$	44,88 (34,45-55,15) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
		$\times 10^6$	0,209 (0,118-0,270) $p_1 < 0,05$	0,449 (0,351-0,603) $p_1 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	%	14,61 (9,89-19,32) $p_1 < 0,05$	20,12 (17,89-22,34) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
		$\times 10^6$	0,292 (0,198-0,386) $p_1 < 0,05$	0,201 (0,158-0,347) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инfiltrативный	%	4,15 (3,81-11,52) $p_2 < 0,05$	11,93 (9,85-24,48) $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
		$\times 10^6$	0,042 (0,020-0,051) $p_2 < 0,05$	0,119 (0,090-0,127) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_4 < 0,05$
	Диссеминированный	%	8,22 (5,24-10,97) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	10,30 (9,39-13,32) $p_2 < 0,05$
		$\times 10^6$	0,082 (0,070-0,121) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,103 (0,088-0,125) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

При оценке содержания CCR3-позитивных эозинофилов в интактной

культуре клеток *in vitro* было установлено достоверное увеличение абсолютного и относительного количества клеток, несущих CCR3, только у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров, тогда как у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофильной реакцией крови относительное и абсолютное количество CCR3-экспрессирующих эозинофилов соответствовало норме с небольшой тенденцией к его увеличению при диссеминированной форме туберкулезной инфекции (табл. 7).

При сравнительном исследовании числа эозинофильных лейкоцитов, экспрессирующих CCR3, наибольшее количество CCR3-позитивных эозинофилов ( $0,547 (0,481-0,621) \times 10^6$ ) в крови было выявлено у пациентов с ДТЛ без эозинофилии (табл. 7).

Исследование культуры эозинофилов, индуцированной *in vitro* рекомбинантным IL-5, позволило установить достоверное увеличение относительного и абсолютного числа 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, абсолютное содержание эозинофилов, экспрессирующих CCR3, напротив, было ниже контрольных значений (незначительно) и соответствующих показателей у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 7).

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. 7).

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.).

Содержание CCR3-позитивных клеток в *in vitro* культуре эозинофилов крови у больных туберкулезом легких (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы обследованных лиц		CCR3-позитивные эозинофилы		
			Интактная культура	С рекомбинантным IL-5
Здоровые доноры		%	6,340 (5,120-7,020)	18,870 (9,130-20,720) p <sub>4</sub> <0,05
		×10 <sup>6</sup>	0,063 (0,045-0,075)	0,189 (0,116-0,215) p <sub>4</sub> <0,05
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	%	5,670 (3,140-6,380)	14,470 (10,320-29,610) p <sub>4</sub> <0,05
		×10 <sup>6</sup>	0,057 (0,023-0,071)	0,145 (0,095-0,157) p <sub>4</sub> <0,05
	Диссеминированный	%	8,210 (7,79-18,52)	12,76 (8,15-22,34)
		×10 <sup>6</sup>	0,082 (0,063-0,100) p <sub>3</sub> <0,05	0,128 (0,103-0,447) p <sub>3</sub> <0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	Инфильтративный	%	17,90 (14,56-19,52) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05	36,63 (23,36-47,28) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05
		×10 <sup>6</sup>	0,179 (0,072-0,229) p <sub>1</sub> <0,05	0,366 (0,235-0,371) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>4</sub> <0,05
	Диссеминированный	%	54,69 (26,81-63,49) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	45,99 (35,31-72,42) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
		×10 <sup>6</sup>	0,547 (0,481-0,621) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05 p <sub>3</sub> <0,05	0,460 (0,400-0,638) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05

Таким образом, в результате проведенного исследования рецепторэкспрессирующей функции эозинофилов у больных ТЛ с

эозинофилией зарегистрировано повышенное содержание клеток, несущих рецептор к IL-5, в то время как повышенное число CCR3-позитивных эозинофилов отмечалось у больных ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии. При инкубации эозинофилов *in vitro* с рекомбинантным IL-5 установлен факт повышения их IL-5R-экспрессирующей активности при отсутствии значимых изменений со стороны способности экспрессировать рецептор к эотаксину у больных ИТЛ с эозинофилией и без таковой.

### **3.5. Анализ распределения генотипов и аллельных вариантов генов цитокинов и их рецепторов у больных туберкулезом легких**

При исследовании распределения частот 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 раза чаще, чем гетерозиготный *CT* (23,5%) и в 8 раз чаще, чем гомозиготный генотип по аллелю *T* (8,8%). В группе больных ТЛ без эозинофилии наблюдались схожие тенденции, наиболее часто встречался гомозиготный генотип *CC* (50,4%) данного полиморфизма (табл. 8).

Статистический анализ выявил значимые различия в распределении генотипов полиморфизма *C-703T* гена *IL5* между здоровыми донорами и больными ТЛ, сопровождающимся 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. 8).



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

Группы обследованных лиц	Генотипы			$\chi^2$	Аллели		$\chi^2$
	<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 $p_1 > 0,05$	68,7%	31,3%	0,36 $p_1 > 0,05$
				6,61 $p_2 < 0,05$			6,41 $p_2 < 0,05$

Примечание: Здесь и в табл. 9, 10, 11:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – у больных туберкулезом легких с эозинофилией.

При исследовании полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA* у здоровых лиц было 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. 9).

Проведенный статистический анализ не выявил 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  $\chi^2=2,21$ ,  $p_2 > 0,05$ ) (табл. 9).

Таблица 9

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

Группы обследованных лиц	Генотипы			$\chi^2$	Аллели		$\chi^2$
	<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 $p_1 > 0,05$  2,21 $p_2 > 0,05$	75,7%	24,3%	0,22 $p_1 > 0,05$  0,93 $p_2 > 0,05$

Анализ распределения генотипов полиморфного сайта *A-384G* гена *эотаксина* показал, что среди пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией крови, чаще встречались носители гомозиготного генотипа *AA* (44,1%) и 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. 10).

При сравнительном исследовании у больных ТЛ с эозинофильной реакцией крови гомозиготный генотип *AA* полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* 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%). Частоты встречаемости гетерозиготного генотипа *AG* данного полиморфного участка при ТЛ с эозинофилией, ТЛ без эозинофилии и у здоровых доноров были практически сопоставимыми (31,4%, 33,9% и 32,5% соответственно) (табл. 10).

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

Группы обследованных лиц	Генотипы			$\chi^2$	Аллели		$\chi^2$
	<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 $p_1 > 0,05$	68,3%	31,7%	2,30 $p_1 > 0,05$
				3,33 $p_2 > 0,05$			3,37 $p_2 > 0,05$

В ходе статистической проверки 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 *эотаксина* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и здоровых доноров. Однако при сравнении распределения аллельных вариантов и генотипов полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* у пациентов с ТЛ в зависимости от числа эозинофильных гранулоцитов в периферической крови статистически значимых различий выявлено не было (табл. 10).

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. 11).

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 *TT* варианта 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. 11).

Таблица 11

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

Группы обследованных лиц	Генотипы			$\chi^2$	Аллели		$\chi^2$
	<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 $p_1>0,05$	73,0%	27,0%	1,05 $p_1>0,05$
				10,85 $p_2<0,01$			11,81 $p_2<0,001$

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 здоровых доноров. Статистически значимых различий в распределении генотипов и аллелей этого полиморфизма между больными ТЛ без эозинофилии и здоровыми донорами выявлено не было (табл. 11).

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 (табл. 11).

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

Аллельный полиморфизм, как результат чаще всего точечных мутаций, в большинстве случаев связан с некодирующими районами генов цитокинов или затрагивает область промотора, не оказывая влияния на аминокислотную последовательность транслируемого белка. Однако часть из них может влиять на скорость транскрипции генов, стабильность мРНК и тем самым приводить к увеличению или уменьшению количества и уровня биологической активности синтезируемого пептида [Симбирцев А. С., Громова А. Ю., 2005].

В связи с этим была предпринята попытка найти ассоциации аллельных вариантов полиморфных сайтов *C-703T* гена *IL-5*, *G-80A* гена *IL-5RA*, *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3* с содержанием соответствующих цитокинов в крови и экспрессией комплементарных им рецепторов на эозинофилах.

Известно, что полиморфизм *C-703T* гена *IL-5* находится в промоторной области гена, что теоретически может быть 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 была характерной для носителей гомозиготного генотипа по аллелю *C*, а минимальная – для носителей гомозиготного генотипа по аллелю *T* (табл. 12).

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. 12).

Содержание IL-5 в крови (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *C-703T* гена *IL5*, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

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 уровней данного цитокина в крови у больных ТЛ с эозинофилией, несущих генотипы *CC*, *CT* и *TT* полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5*, по сравнению с таковыми у больных ТЛ без эозинофилии ( $p_2 < 0,05$ ) (табл. 12).

Исходя из того, что полиморфизм *G-80A* гена *IL5RA* находится в промоторном участке гена, был проведен анализ содержания IL-5RA-позитивных эозинофилов в зависимости от аллельного варианта этого полиморфного участка (табл. 13).

Содержание IL-5RA-позитивных клеток в *in vitro* культуре эозинофилов крови ( $\times 10^6$ ) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *G-80 A* гена *IL5RA*, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

IL-5RA-позитивные эозинофилы		Группы обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
			С эозинофилией	Без эозинофилии
GG	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) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
GA	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) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
AA	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*.

Было показано, 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. 9). При этом у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой (носителей гомозиготных генотипов по аллелям *G* и *A*, а также у гетерозигот *GA*)

содержание IL-5RA-позитивных эозинофилов в интактной культуре и в условиях инкубации с рекомбинантным (r) IL-5 достоверно превышало соответствующие показатели в группе здоровых доноров ( $p_1 < 0,05$ ). Статистически значимое увеличение количества эозинофилов, экспрессирующих IL-5RA, в базальной и индуцированной культурах среди гомозигот *GG*, *AA* и гетерозигот *GA* полиморфного сайта *G-80A* гена *IL5RA* отмечалось также у больных ТЛ с эозинофилией по сравнению с таковым у пациентов ТЛ без эозинофилии ( $p_2 < 0,05$ ) (табл. 13).

Статистический анализ позволил также установить значимое увеличение количества IL-5RA-положительных клеток в культуре *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 генотипов *GG* и *GA* (табл. 13).

Согласно данным литературы, аллельные варианты полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* могут обуславливать различный фенотипический эффект. При изучении уровня эотаксина в крови в зависимости от аллельных вариантов полиморфного сайта *A-384G* гена *эотаксина* было установлено, что среди всех обследованных лиц максимальный уровень медиатора в крови обнаруживался у гомозигот по аллелю *G*, а минимальный - у гомозигот по аллелю *A* (табл. 14). 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 была зарегистрирована лишь тенденция, но статистически значимых отличий выявлено не было (табл. 14).

Следует отметить, что концентрация эотаксина 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 1,8 раза, соответственно, - у носителей генотипов *AG* и *GG* полиморфизма *A-384G*



гена *эотаксина* (табл. 14). Среди больных ТЛ без эозинофилии повышенная концентрация *эотаксина* в крови отмечалась лишь у гетерозигот *AG* (*A-384G*) по сравнению с контрольными значениями. Кроме этого, было установлено статистически значимое увеличение содержания *эотаксина* в крови у пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (носителей генотипов *AA*, *GG* и *AG* полиморфного участка *A-384G* гена *эотаксина*), по сравнению с таковыми у больных ТЛ без эозинофилии (табл. 14).

Таблица 14

Содержание *эотаксина* в крови (пг/мл) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *A-384G* гена *эотаксина*, Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

Генотипы полиморфизма <i>A-384G</i> гена <i>эотаксина</i>	Группы 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 *эотаксина*.

Известно, что полиморфизм *T-51C* расположен в промоторной области гена *CCR3*, следовательно, теоретически замена тимина на цитозин в позиции -51 п.н. относительно стартовой точки транскрипции должна 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. 15).

Обращало на себя внимание 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 в группе 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) ( $p_2 < 0,05$ ) (табл. 15).

Статистический анализ позволил также констатировать 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. 15).

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

Содержание CCR3-позитивных клеток в *in vitro* культуре эозинофилов крови ( $\times 10^6$ ) у больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа локуса *T-51C* гена *CCR3*, Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)

CCR3-позитивные эозинофилы		Группы обследованных лиц		
		Здоровые доноры	Больные туберкулезом легких	
			С эозинофилией	Без эозинофилии
TT	Интактная культура	0,059 (0,053-0,067)	0,065 (0,054-0,123)	0,244 (0,201-0,276) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	С рекомбинантным IL-5	0,123 (0,097-0,135) p <sub>3</sub> <0,05	0,126 (0,106-0,294) p <sub>3</sub> <0,05	0,289 (0,243-0,307) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
TC	Интактная культура	0,063 (0,044-0,071)	0,078 (0,066-0,149)	0,271 (0,240-0,304) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	С рекомбинантным IL-5	0,117 (0,106-0,131) p <sub>3</sub> <0,05	0,097 (0,075-0,104)	0,294 (0,256-0,300) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
CC	Интактная культура	0,068 (0,059-0,075)	0,084 (0,080-0,100)	0,312 (0,197-0,321) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05
	С рекомбинантным IL-5	0,137 (0,118-0,165) p <sub>3</sub> <0,05	0,107 (0,094-0,131)	0,293 (0,187-0,326) p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,05

Примечание: p<sub>1</sub> – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p<sub>2</sub> – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p<sub>3</sub> – по сравнению с интактной культурой клеток внутри одной группы обследованных; TT/ТС, ТС/СС, TT/СС – в зависимости от аллельного варианта локуса *T-51C* гена *CCR3*.

Обнаружение ассоциации эозинофилии крови с определенным генотипом или комбинацией генотипов обуславливает возможность создания индивидуального прогноза возникновения эозинофилии при ТЛ, биологическое значение которой в отношении течения инфекционного процесса, вызванного *Mycobacterium tuberculosis*, на сегодняшний день до

конца не изучено.

### 3.7. Содержание CD3<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> лимфоцитов и IFN- $\gamma$ в крови у больных туберкулезом легких

Как показало проведенное исследование, относительное и абсолютное количество лимфоцитов в периферической крови у здоровых доноров составило 33,54 $\pm$ 5,29% и (1,88 $\pm$ 0,03) $\times$ 10<sup>9</sup>/л соответственно.

Таблица 16

Содержание CD3<sup>+</sup> и CD20<sup>+</sup> лимфоцитов в периферической крови у больных туберкулезом легких ( $\bar{X} \pm m$ )

Группы обследованных лиц			Общее количество лимфоцитов	CD3 <sup>+</sup> Т-лимфоциты	CD20 <sup>+</sup> В-лимфоциты
Здоровые доноры	%		33,54 $\pm$ 5,29	71,08 $\pm$ 5,08	7,13 $\pm$ 3,07
	$\times 10^9$		1,88 $\pm$ 0,03	1,34 $\pm$ 0,15	0,13 $\pm$ 0,01
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	ИТЛ	%	35,15 $\pm$ 7,29	43,14 $\pm$ 3,76 $p_1 < 0,05$	17,09 $\pm$ 1,12 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9$	3,49 $\pm$ 1,75 $p_1 < 0,05$	1,51 $\pm$ 0,21	0,59 $\pm$ 0,04 $p_1 < 0,05$
	ДТЛ	%	19,23 $\pm$ 7,01 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	40,93 $\pm$ 3,84 $p_1 < 0,05$	23,67 $\pm$ 7,02 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9$	2,24 $\pm$ 1,06 $p_3 < 0,05$	0,92 $\pm$ 0,19 $p_1 < 0,05$	0,53 $\pm$ 0,09 $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	ИТЛ	%	24,78 $\pm$ 6,23 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	49,18 $\pm$ 2,81 $p_1 < 0,05$	18,33 $\pm$ 0,96 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9$	2,43 $\pm$ 0,98 $p_2 < 0,05$	1,19 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01 $p_2 < 0,05$
	ДТЛ	%	16,32 $\pm$ 5,19 $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	51,43 $\pm$ 5,15 $p_1 < 0,05$	19,34 $\pm$ 3,22 $p_1 < 0,05$
		$\times 10^9$	1,60 $\pm$ 0,75 $p_3 < 0,05$	0,82 $\pm$ 0,11 $p_1 < 0,05$	0,16 $\pm$ 0,01 $p_2 < 0,05$

Примечание. Здесь и в табл. 17:  $p_1$  – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров;  $p_2$  – у пациентов с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией;  $p_3$  – у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких. ИТЛ – инфильтративный туберкулез легких, ДТЛ – диссеминированный туберкулез легких.

Исследование общего количества лимфоцитов периферической крови у пациентов с ТЛ выявило статистически значимое снижение относительного содержания этих клеток в крови больных ДТЛ с эозинофилией и пациентов с ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров. При этом абсолютное содержание лимфоцитов у больных ТЛ без эозинофилии и ДТЛ с эозинофилией значимо не отличалось от контрольных значений, а у больных ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно увеличивалось (табл. 16).

При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой было зарегистрировано статистически значимое снижение (по сравнению с контрольными значениями) относительного и абсолютного числа  $CD3^+$  Т-лимфоцитов. Исключение составили группы больных ИТЛ, сопровождающиеся эозинофилией и без эозинофильной реакции, у которых абсолютное содержание Т-лимфоцитов в крови соответствовало норме (табл. 16).

На фоне пониженного числа  $CD3^+$  Т-лимфоцитов в ходе исследования было обнаружено достоверное повышение относительного и абсолютного числа  $CD20$ -презентирующих В-лимфоцитов в периферической крови у больных ТЛ с эозинофилией. У пациентов с ТЛ, в крови которых количество эозинофилов соответствовало норме, было зарегистрировано повышение лишь относительного числа  $CD20^+$  В-лимфоцитов, в то время как абсолютное их количество сохранялось в пределах нормы (табл. 16).

Исследование содержания  $IFN-\gamma$  (ключевого противотуберкулезного цитокина) в крови при ТЛ позволило констатировать снижение данного показателя у больных ИТЛ и ДТЛ, сопровождающимся эозинофилией. У пациентов с туберкулезной инфекцией без эозинофилии, как при ИТЛ, так и при ДТЛ, данный показатель не отличался от контрольных значений (табл. 17).

Содержание IFN- $\gamma$  в крови (пг/мл) у больных туберкулезом легких  
(Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Группы обследованных лиц		IFN- $\gamma$ , пг/мл
Здоровые доноры		8,78 (5,57-9,41)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	Инфильтративный	6,15 (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	9,07 (8,80-11,54) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Таким образом, у больных ТЛ, как с эозинофилией, так и без таковой, были зарегистрированы относительная лимфоцитопения, а также дефицит CD3<sup>+</sup> 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- $\gamma$  в сочетании с повышением абсолютного содержания CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов в крови.

#### **Глава 4. Обсуждение результатов исследования**

Содержание эозинофилов в периферической крови при туберкулезе легких (ТЛ) может варьировать от повышенного до анэозинофилии [Rothenberg M. E., 2007; Simon D. et al., 2007]. Большинство исследователей связывают развитие эозинофилии крови лишь с побочным действием проводимой противотуберкулезной химиотерапии и исходной аллергической настроенностью организма. Так, по данным А. В. Мордык [2010], эозинофилия крови составляет 20-25 % от всех аллергических реакций и выявляется в 2-5 % случаев на фоне проводимой противотуберкулезной химиотерапии. В свою очередь, по результатам исследования В. Ю. Мишина [2004] эозинофилия крови регистрируется в 22 % случаев на фоне лечения противотуберкулезными препаратами и составляет 60 % от всех аллергических реакций, к которым относятся также отек Квинке, анафилактический шок и кожно-аллергический синдром. Интересно отметить, что у 17% больных эозинофилия сочетается с поражениями печени и почек, а также органными повреждениями нейротоксического характера. Согласно анализа медицинских карт пациентов, находящихся на стационарном лечении во фтизиатерапевтическом отделении №1 (зав. отд. – О. И. Новосельцева) Томской областной туберкулезной клинической больницы (гл. врач – канд. мед. наук Г. В. Янова), эозинофильная реакция крови регистрировалась в 30 % случаев туберкулезной инфекции (30 человек на 100 обследованных лиц) на фоне проводимой специфической химиотерапии препаратами основного (первого) ряда (изониазид, рифампицин, стрептомицин, пипразинамид и этамбутол). При этом в большинстве случаев эозинофилия протекала бессимптомно и являлась единственным проявлением гиперчувствительности к противотуберкулезным препаратам. В отдельных случаях были зарегистрированы побочные реакции токсико-аллергического характера: диспепсические расстройства – в 5 % случаев (у 5 пациентов), нейропатии – в 2 %, снижение слуха – в 1 %, кожная сыпь – в 6 %.

Согласно приказу Минздрава России от 21.03.2003 №109 (Приложение №8 «Инструкция по химиотерапии больных туберкулезом»), развитие аллергических реакций (эозинофилия крови) в ходе лечения является показанием для исключения препарата основной группы из терапии и заменой его на препарат резервного ряда. Однако установлено, что эозинофилия чаще встречается именно при приеме резервных противотуберкулезных препаратов (амикацин, канамицин, ПАСК – парааминосалициловая кислота) [Мишин В. Ю. и соавт., 2004; Колодийчук Е. В. и соавт., 2007; Михеева О. М. и соавт., 2010]. Данное обстоятельство накладывает определенные ограничения на проведение адекватных лечебных мероприятий.

Наряду с лекарственной эозинофилией, в клинической практике врачей-фтизиатров нередко регистрируются случаи эозинофильной реакции крови у больных ТЛ до назначения специфической терапии. Так, в исследованиях, проводимых на кафедрах фтизиатрии и пульмонологии и патофизиологии СибГМУ, было показано наличие эозинофильной реакции крови при ТЛ до лечения [Филинюк О. В., 2001; Земляная Н. А. и соавт., 2007; Воронкова О. В. и соавт., 2007]. Зарубежные авторы также подтверждают факт эозинофилии крови у впервые выявленных больных с туберкулезной инфекцией до проведения химиотерапии [Kirman J. et al., 2009; Legrand F. et al., 2009]. При этом специалисты затрудняются однозначно интерпретировать причины и целесообразность возникновения данной гематологической реакции при ТЛ.

В ходе настоящего исследования умеренная эозинофилия периферической крови регистрировалась в 18% случаев ТЛ до назначения противотуберкулезных препаратов. Максимальное увеличение абсолютного числа эозинофилов было зарегистрировано у больных с диссеминированной формой ТЛ.

Изучение молекулярных механизмов формирования реактивной эозинофилии крови при патологии, в том числе при ТЛ, предполагает оценку



ключевых факторов, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов: IL-5, IL-4, IL-3, GM-CSF и эотаксина. Эти медиаторы принимают активное участие в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза, дегрануляции, осуществлении механизмов цитотоксичности и хемотаксиса лейкоцитов эозинофильного ряда [Morshed M. et al., 2012].

Известно, что инфекция, вызванная *M. tuberculosis*, характеризуется дисбалансом продукции цитокинов, регулирующих клеточные и гуморальные реакции иммунитета [Воронкова О. В. и соавт., 2007; Лядова И. В., Гергерт В. Я., 2009]. Преобладание медиаторов гуморального звена иммунного ответа, многие из которых обладают эозинофилактивирующими свойствами, по-видимому, может обуславливать формирование эозинофильной реакции крови при данной патологии. В связи с этим в ходе настоящего исследования у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией и без эозинофилии, была проведена оценка содержания в крови ключевых иммунорегуляторных цитокинов, опосредующих Th2-иммунный ответ и регулирующих основные функции эозинофильных гранулоцитов (IL-5 и эотаксина).

IL-5 является основным медиатором гуморального звена иммунитета, стимулирует финальные стадии эозинофилопоэза в костном мозге, инициирует выход зрелых клеток и клеток-предшественниц в циркуляцию. Кроме того, он активирует дегрануляцию эозинофилов, образование лейкотриенов (LTC<sub>4</sub>) и супероксидных анионов, пролонгирует пребывание эозинофильных гранулоцитов в крови и тканях, подавляя апоптоз [Li H. et al., 2004; Rothenberg M. E. et al., 2007; Liu X.-Q. et al., 2008; Kouro T. et al., 2009; Rosenberg H. F. et al., 2009; Takatsu K., 2011].

Эозинофилактивирующие свойства данного цитокина подтвердились в ходе настоящего исследования, согласно результатам которого, достоверное повышение концентрации IL-5 в крови было зарегистрировано лишь у пациентов с инфильтративным ТЛ (ИТЛ) и диссеминированным ТЛ (ДТЛ), ассоциированными с эозинофилией крови, тогда как содержание данного

медиатора в крови у больных ТЛ без эозинофилии не отличалось от контрольных значений (табл. 4). Наряду с этим, у больных ДТЛ, сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, была установлена положительная корреляционная зависимость между уровнем IL-5 и количеством эозинофильных гранулоцитов в крови ( $r=0,687$ ,  $p<0,05$ ). У пациентов данной группы также отмечалась более высокая концентрация IL-5 в крови по сравнению с таковой у больных ИТЛ с эозинофилией, что в свою очередь, обуславливало более выраженный характер эозинофильной реакции крови у больных ДТЛ (табл. 4).

Повышенный уровень IL-5 в крови у больных ТЛ с эозинофилией может поддерживаться за счет секреторной активности многих клеток-продуцентов данного цитокина: Th2-лимфоцитов, В-лимфоцитов, цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток - основных участников противотуберкулезной резистентности макроорганизма. IL-5 способны секретировать и сами эозинофильные гранулоциты [Lintomen L. et al., 2007; Johnson V. J. et al., 2008; Mirza S. et al., 2010; Wise E. L. et al., 2010].

Для уточнения вклада эозинофилов в механизм формирования эозинофилии крови при ТЛ нами была проанализирована их цитокинсекреторная активность. Как показали результаты проведенного исследования, содержание IL-5 в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов оказалось повышенным лишь у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови (табл. 5).

Помимо оценки базальной продукции IL-5 проводилась инкубация эозинофильных гранулоцитов с вакцинным штаммом BCG *in vitro*. Выбор индуктора был обусловлен современными представлениями относительно способностей эозинофильных гранулоцитов взаимодействовать с микобактериями разных видов с последующим высвобождением различных цитокинов [Legrand F. et al., 2009; Корецкая Н. М., 2011].

В ходе проведенного исследования BCG-индуцированная секреция IL-5 эозинофильными лейкоцитами периферической крови оказалась

достоверно выше у пациентов с ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров и у пациентов с ТЛ без эозинофилии (табл. 5). Результаты исследования позволяют заключить, что у больных ТЛ эозинофильные гранулоциты в условиях их избыточного содержания, поддерживаемого высоким уровнем IL-5 в крови, обладают свойством самостоятельно секретировать большие количества данного медиатора и, выступая в качестве аутокринных и паракринных стимуляторов собственной дифференцировки и активации, вносят определенный вклад в развитие эозинофильной реакции крови и пролонгирование 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.

Реактивный характер эозинофилии крови при ТЛ подтверждается также результатами количественной оценки другого эозинофил-активирующего медиатора – эотаксина (табл. 4). Установлено, что эотаксин, с одной стороны, опосредует длительное пребывание эозинофилов в кровотоке, а с другой – инициирует процесс адгезии эозинофильных лейкоцитов к эндотелию сосудов с последующей их миграцией в очаг гранулематозного воспаления [Pease J. E. et al., 2006; Paplinska M. et al., 2007; Rothenberg M. E. et al., 2007; Haley K. J. et al., 2008; Zafra M. P. et al., 2012]. Этот хемокин CC-семейства привлекает в очаг воспаления исключительно эозинофилы, что было продемонстрировано на различных моделях *in vivo*, при этом данный эффект усиливается в присутствии IL-5. Эотаксин опосредует не только активацию и хемотаксис 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].

В ходе настоящего исследования было зарегистрировано значительное повышение уровня эотаксина в крови у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией (табл. 4).

Известно, что эозинофильные гранулоциты выступают в качестве активных продуцентов эотаксина, избыточная концентрация которого может активировать механизмы, обеспечивающие накопление эозинофилов в крови. Однако у больных ДТЛ без эозинофилии концентрация эотаксина в крови оказалась сопоставимой с таковыми значениями у больных ТЛ, в крови которых количество эозинофилов превышало норму (табл. 4).

Одним из возможных факторов избыточного содержания эотаксина в крови у больных ТЛ может быть опосредованное влияние IL-4 и IL-13, которые в дозозависимости стимулируют экспрессию мРНК эотаксина в фибробластах кожи. Так, на модели лабораторных животных было показано, что повышенная продукция IL-4 опухолевыми клетками индуцировала накопление эозинофильных гранулоцитов посредством повышения мРНК эотаксина, введение антиIL-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, что IL-4 в синергизме с провоспалительными цитокинами, в частности с TNF- $\alpha$ , концентрация которого при туберкулезной инфекции нередко бывает повышенной, активируют продукцию эотаксина фибробластами легких [Lewis T. C. et al., 2012].

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что гиперсекреция эотаксина, зарегистрированная у пациентов с ТЛ независимо от наличия эозинофильной реакции крови, подтверждает скорее хемотаксические свойства этого медиатора, способного опосредовать миграцию клеток в зону гранулематозного воспаления. Данный тезис подтверждается наличием отрицательной корреляционной связи между содержанием эотаксина в крови и абсолютным числом эозинофилов в крови у пациентов с ИТЛ и ДТЛ без эозинофилии ( $r=-0,69$ ,  $p<0,05$  и  $r=-0,61$ ,  $p<0,05$  соответственно). В связи с

этим в качестве причинного фактора эозинофилии при ТЛ, по-видимому, следует рассматривать, прежде всего, IL-5, концентрация которого в крови была повышенной лишь у пациентов с эозинофилией (табл. 4).

Общеизвестно, что действие цитокинов реализуется при взаимодействии со специфическими рецепторами на поверхности клеток-мишеней [Kabesch M. et al., 2007]. Установлено, что лейкоциты эозинофильного ряда экспрессируют на своей поверхности разнообразные антигенные структуры, среди которых выделяют CD13 и CD33 (общие маркеры, свойственные гранулоцитарному ростку), молекулы, определяющие способность к адгезии и активации (CD9, CD18, CD25, CD28L, CD62L, CD37, CD69), рецепторы для активированных компонентов комплемента, Fc-рецепторы для молекул IgE и IgG, рецепторы для гистамина, простагландина D<sub>2</sub>, хемокинов семейства CC и др. [Rothenberg M. E. et al., 2007]. При изучении механизмов формирования эозинофилии крови несомненный интерес представляет оценка экспрессии рецепторов для эозинофил-специфичных цитокинов (IL-5 и эотаксина), количество которых значительно возрастает на мембране клетки после ее активации антигенными детерминантами.

С использованием метода проточной цитофлуориметрии нами была проведена оценка *in vitro* экспрессии на эозинофилах, выделенных из крови больных ТЛ, ассоциированным с эозинофилией крови и без таковой, рецепторов к IL-5 (IL-5RA) и эотаксину (CCR3). В результате было показано достоверное повышение количества эозинофилов, несущих IL-5RA, в интактной культуре клеток у больных ИТЛ и ДТЛ с эозинофилией (табл. 6), что может быть связано с опосредованным влиянием одноименного цитокина, избыточные концентрации которого были обнаружены в крови лишь у пациентов данных групп.

Полученные нами данные не противоречат результатам других исследователей, констатирующих факт повышенной экспрессии IL-5RA на эозинофильных лейкоцитах при описторхозной инвазии и некоторых онкогематологических заболеваниях, ассоциированных с эозинофильной

реакцией крови [Литвинова Л. С. и соавт., 2007]. Существование тесной взаимосвязи изученных показателей авторы подтвердили наличием положительной корреляционной зависимости между уровнем базальной продукции мононуклеарами крови IL-5 и количеством IL-5RA-позитивных клеток (соответственно  $r=0,64$ ,  $p<0,05$  – у больных с острым описторхозом и  $r=0,511$ ,  $p<0,05$  – у пациентов с лимфогранулематозом). С избирательной экспрессией IL-5RA на ранних клетках-предшественниках эозинофилов в костном мозге (при взаимодействии с IL-5) также связывают развитие эозинофилии крови при бронхиальной астме [Sehmi R. et al., 1997].

Обращало на себя внимание также увеличение количества IL-5RA-позитивных клеток в группе пациентов с ДТЛ без эозинофилии (табл. 6). Гиперэкспрессия IL-5RA на мембране эозинофильных клеток в условиях нормального содержания IL-5 в крови, по-видимому, может быть обусловлена действием других цитокинов, к примеру, IL-3, IL-4 и GM-CSF, 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 частности, показано, что IL-4 *in vitro* индуцирует экспрессию рецепторов на мембране эозинофилов и активирует их [Haley K. J. et al., 2008; Palikhe N. S. et al., 2010].

Наряду с изучением базального уровня экспрессии IL-5RA на эозинофильных гранулоцитах, отражающего фоновую активность клеток, в ходе настоящего исследования эозинофилы инкубировались с рекомбинантным IL-5 (rIL-5) – ключевым цитокином, модулирующим их функциональную активность. При добавлении в культуру клеток rIL-5 повышение содержания IL-5RA-несущих эозинофилов устанавливалось у всех больных ТЛ независимо от наличия эозинофильной реакции крови (табл. 6). При определении соотношения числа клеток, несущих IL-5RA, в базальной и rIL-5-индуцированной культуре было показано увеличение индекса стимуляции у больных ИТЛ с эозинофилией и без нее (табл. 6).

Данное обстоятельство позволяет думать о том, что гиперэкспрессия эозинофилами IL-5RA может быть как следствием повышения концентрации IL-5 в крови, так и одной из причин повышенной чувствительности клеток к IL-5 при туберкулезной инфекции.

Анализ содержания CCR3-экспрессирующих эозинофилов у больных ТЛ позволил установить его увеличение в интактной культуре клеток *in vitro* лишь в группе пациентов без эозинофильной реакции крови (табл. 7).

Известно, что CCR3 *in vivo* опосредует хемотаксис клеток в легочную ткань при действии эотаксина. По всей видимости, повышенное число эозинофильных лейкоцитов, экспрессирующих CCR3, в сочетании с высоким уровнем эотаксина в крови у больных ТЛ без эозинофилии, указывает на ключевую роль комплекса «эотаксин – CCR3» в механизмах рекрутирования эозинофилов в зону гранулематозного воспаления. По данным Л. С. Литвиновой и соавт. [2007], данный механизм лежит в основе инфильтрации эозинофильными гранулоцитами регионов пребывания гельминтов при хроническом описторхозе. Авторами установлена положительная корреляция между значениями стимулированной *r*-eotaxin презентации CCR3 и уровнем эотаксина в крови ( $r=0,710$ ,  $p<0,05$ ) у этих больных.

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

Таким образом, анализ ключевых эозинофилактивирующих медиаторов, реализующих свое действие через специфические рецепторы, позволяет заключить, что высокое содержание IL-5 в периферической крови и гиперэкспрессия IL-5RA на мембране эозинофилов составляют основу

продолжительного пребывания эозинофильных лейкоцитов в кровотоке при туберкулезной инфекции.

Анализируя причины высокого содержания эозинофил-активирующих цитокинов в крови и количества эозинофилов, несущих IL-5RA и CCR3 у больных ТЛ, необходимо учитывать тот факт, что уровень медиаторов, выделяемых клетками, и уровень экспрессии их рецепторных структур генетически детерминированы. В современной литературе представлены многочисленные данные о наличии ассоциативных связей аллельных вариантов генов цитокинов с характером экспрессии соответствующих белковых продуктов и предрасположенностью к той или иной патологии [Sehmi R., 1997; Фрейдин М.Б. и соавт., 2004; June-Hyuk Lee et al., 2007; Namkung J. H. et al., 2007].

В ходе проведенного исследования было показано, что у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, распределение аллелей и генотипов полиморфных сайтов генов исследуемых цитокинов и рецепторов значительно отличалось от такового в группе здоровых доноров и больных ТЛ без эозинофилии (табл. 8-11).

Известно, что ген *IL5* расположен в регионе 5q23-31 и включает 4 экзона. В промоторной области данного гена идентифицирован полиморфный сайт в положении -703, единичная замена нуклеотида в котором оказывает влияние на наработку исследуемого белка. Так, М.Б. Фрейдиным и соавт. [2002] установлено, что функциональный полиморфизм *C-703T* гена *IL5* ассоциирован с бронхиальной астмой и количеством эозинофилов в периферической крови. В свою очередь, Е. В. Калмыковой [2009] показано, что полиморфизм *C-703 T* гена *IL5* ассоциирован с особенностями проявления и характером прогрессирования хронического гломерулонефрита. По результатам N. Yamamoto et al. [2003], данный полиморфизм ассоциирован с высоким содержанием эозинофилов в периферической крови при атопическом дерматите.



В ходе настоящего исследования было установлено изменение частот аллельных вариантов полиморфного сайта *C-703 T* гена *IL-5* среди больных ТЛ, заключающееся в преобладании гомозиготного генотипа *CC* над гетерозиготным *CT* и гомозиготным *TT* генотипами. При статистическом исследовании были показаны значимые различия в распределении генотипов между здоровыми донорами и больными ТЛ, сопровождающимся эозинофилией. Наряду с этим, выявлено существенное различие в распределении аллелей и генотипов полиморфного сайта *C-703T* гена *IL-5* между больными ТЛ с эозинофилией и без (табл. 8). Проведенный анализ распределения аллелей и генотипов полиморфизма *C-703T* гена *IL-5* позволил установить при ТЛ положительную ассоциацию гомозиготного генотипа *CC*, а также аллеля *C* с эозинофильной реакцией крови и соответственно протективный в отношении эозинофилии эффект генотипов *CT* и *TT*, а также аллеля *T* (рис. 2).

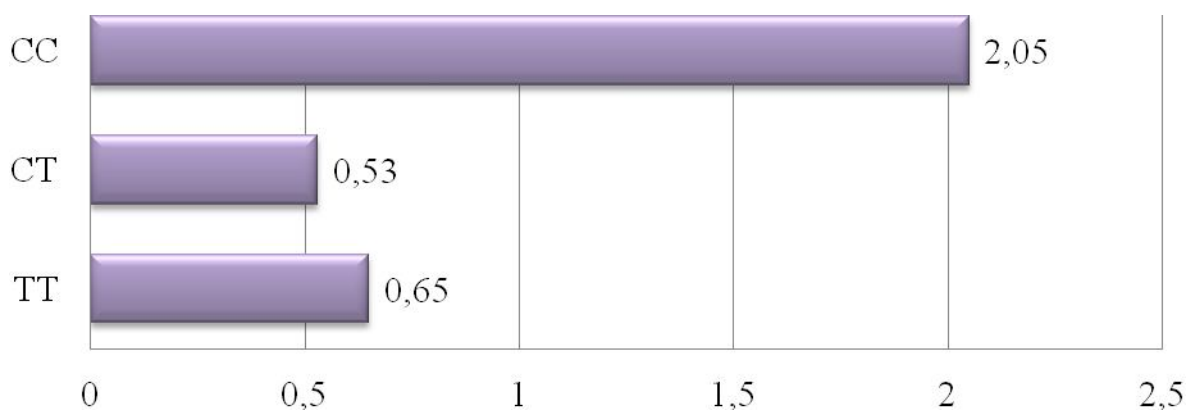


Рис. 2. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа полиморфного сайта *C-703T* гена *IL-5*. Слева генотипы полиморфного сайта *C-703T*, справа – критерий отношения шансов (OR)

Следует отметить, что полиморфизм *C-703T* гена *IL5* расположен в промоторной области гена и осуществляет контроль транскрипции и последующего синтеза *IL-5*. Результаты проведенных исследований

показали роль таких транскрипционных факторов, как AP-1, GATA-3, Oct1/2, YY1 и Ets1, а при определенных условиях клеточной активации еще и NF-AT, в регуляции экспрессии гена *IL5* [Мордвинов В. А., Фурман Д. П., 2009]. На 5'-конце гена *IL5* обнаружен сайт связывания специфического октамера и белков семейства NFAT. Продукция IL-5 является индуцибельной, для активации транскрипции гена *IL5* необходима активация протеинкиназы C и Ca<sup>2+</sup>-кальмодулиновой системы, что в конечном итоге приводит к фосфорилированию белков семейства NFAT и связыванию их с регуляторной областью гена [Nakamura Y., Hoshino M., 2005; Zhu W. et al., 2010; Endo Y. et al., 2011; Fukushima Y. et al., 2012].

Неоспоримым является факт влияния структуры промоторной области гена на уровень концентрации кодируемого этим геном продукта. В ходе исследования зависимости уровня IL-5 в крови от варианта полиморфного сайта *C-703T* гена *IL5* было установлено, что у индивидов с генотипом *CC* полиморфизма *C-703T* гена *IL5* концентрация IL-5 в крови достоверно превышала таковую у пациентов с генотипами *CT* и *TT*. Таким образом, идентифицирован «высокородуцирующий» генотип *CC* полиморфного сайта *C-703 T* гена *IL5*, ассоциированный с высоким содержанием IL-5 в крови (табл. 12).

Как упоминалось ранее, действие IL-5 осуществляется посредством связывания со специфическим рецептором IL-5RA, кодируемым геном, который расположен на третьей хромосоме. Наиболее изученным является функциональный полиморфизм гена *IL5RA* в положении 80 промоторной области, характеризующийся заменой гуанина на аденин (*G-80A*). Однако сведения литературы, касающиеся связи данного полиморфизма с формированием эозинофильной реакции крови при различных заболеваниях весьма противоречивы. Согласно результатам одних исследователей, полиморфизм *G-80A* гена *IL5RA* ассоциирован с повышенной экспрессией данного рецептора на эозинофильных лейкоцитах и формированием

эозинофилии при бронхиальной астме, и атопическом дерматите [Sehmi R., 1997; Lee J.-H. et al., 2007; Namkung J. H. et al., 2007]. Другие авторы указывают на отсутствие статистически значимой связи полиморфного сайта *G-80A* гена *IL5RA* с развитием бронхиальной астмы, а также с количеством эозинофилов в периферической крови при патологии [Hoffjan S. et al., 2004]. Проведенное нами иммуногенетическое исследование полиморфизма *G-80A* гена *IL5RA* также не выявило существенных различий в распределении аллелей и генотипов у больных ТЛ с эозинофилией и без таковой относительно аналогичных параметров у здоровых доноров, а также при сравнении групп больных ТЛ в зависимости от наличия эозинофильной реакции крови (табл. 9).

По данным литературы, точечная замена гуанина на аденин в положении *80* промоторной области обуславливает повышенную (по сравнению с аллельным вариантом *-80G*) активность промотора и, как результат, гиперэкспрессию  $\alpha$ -цепи IL-5R на клетках. Однако анализ зависимости содержания IL-5RA-позитивных эозинофилов от варианта полиморфного сайта *G-80A* соответствующего гена, проводимый в настоящем исследовании, не выявил каких-либо достоверных различий у больных ТЛ – носителей разных генотипов. Полученные результаты позволяют заключить, что увеличение числа эозинофилов, экспрессирующих на своей поверхности IL-5RA, у больных ТЛ с эозинофилией крови не связано с полиморфизмом *G-80A* гена *IL-5RA*, а может быть результатом действия избыточных концентраций одноименного цитокина.

Другим кандидатом, ответственным за развитие эозинофильной реакции крови, является эотаксин. Ген эотаксина локализован на семнадцатой хромосоме в участке q11.2 и содержит 3 экзона. В результате многих исследований установлено, что функционально значимый полиморфизм гена

эотаксина регистрируется для трех полиморфных сайтов: *-1328*, *-426*, *-384* в промоторной области. Показано, что полиморфизм гена *эотаксина* в положении *-384* (замена аденина на гуанин) ассоциирован с высокой концентрацией эотаксина и уровнем общего IgE в крови [Wang T.-N. et al., 2007; 2010]. В свою очередь, D. Wagsater et al. [2007] показали связь аллеля *G* полиморфного сайта *A-384 G* с развитием рака прямой кишки и, напротив, более низким уровнем эотаксина в плазме крови.

В ходе проведенного иммуногенетического анализа полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* было установлено, что среди пациентов с ТЛ, сопровождающимся эозинофильной реакцией крови, достоверно чаще встречались носители гомозиготного генотипа *AA*, реже – носители гомозиготного генотипа *GG* (табл. 10). Зарегистрированы статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного сайта *A-384G* гена *эотаксина* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и у здоровых доноров. Кроме того, найдена положительная ассоциация аллеля *G* и генотипа *GG (A-384G)* гена *эотаксина* с ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, что свидетельствует о предрасполагающем влиянии данного полиморфизма на формирование эозинофилии при ТЛ; для аллеля *A* и генотипа *AA* был показан протективный эффект в отношении данной гематологической реакции (рис. 3).

Контроль транскрипции гена *эотаксина* связан с промоторной зоной, где расположены участки связывания энхансеров транскрипции NF-κB, AP-1 и STAT6. Продукция эотаксина является индуцибельной, активация транскрипции гена зависит от связывания транскрипционных факторов с регуляторной областью гена [Zafra M. P. et al., 2012]. При анализе концентрации эотаксина в крови в зависимости от аллельных вариантов полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* у больных ТЛ с эозинофилией было показано, что у гомозигот по аллелю *G* отмечался максимальный, а у гомозигот по аллелю *A* и гетерозигот *AG* – минимальный уровень секреции эотаксина (табл. 15). Следовательно, аллельный полиморфизм *A-384G* гена

*эотаксина* обуславливает высокую продукцию *эотаксина*; наличие у больного ТЛ генотипа *GG* исследуемого полиморфного участка *A-384G* гена *эотаксина* и его ассоциация с сывороточным уровнем соответствующего цитокина может лежать в основе развития эозинофилии крови при туберкулезной инфекции.

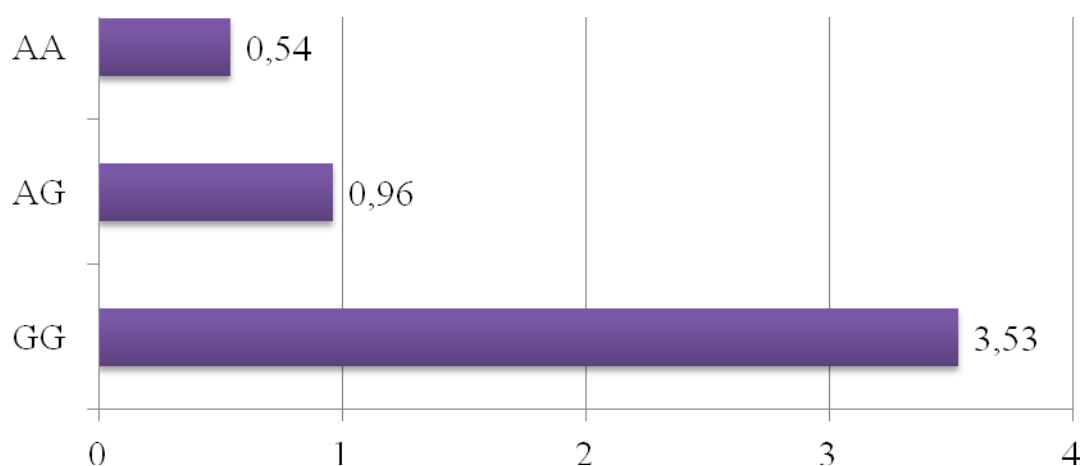


Рис. 3. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа локуса *A-384 G* гена *эотаксина*. Слева генотипы полиморфного сайта *A-384 G*, справа – критерий отношения шансов (OR)

Как упоминалось ранее, действие *эотаксина* осуществляется через специфический рецептор *CCR3*, экспрессированный на эозинофильных гранулоцитах. В промоторной области гена *CCR3* обнаружены несколько полиморфных участков. Установлено, что полиморфизм *T-51C* гена *CCR3* ассоциирован с бронхиальной астмой, атопическим дерматитом, множественным склерозом и гепатитом С [Bugeja M. J. et al., 2006; Al-Abdulhadi S. A. et al., 2010]. При иммуногенетическом исследовании полиморфизма *T-51C* гена *CCR3* нами было обнаружено, что при ТЛ, независимо от количества эозинофилов периферической крови, наиболее частым генотипом является гомозиготный по аллелю *T*, а наиболее редким – гомозиготный вариант *CC*. Однако, среди больных ТЛ с эозинофильной реакцией крови, носители гомозиготного варианта *TT* встречались реже, чем

среди больных ТЛ без эозинофилии, а носители гомозиготного генотипа *СС*, напротив, чаще. При статистическом анализе установлены значимые различия в распределении аллельных вариантов полиморфного сайта *T-51C* гена *CCR3* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и здоровых доноров. Кроме того, показаны статистически значимые различия в распределении аллелей и генотипов полиморфного сайта *T-51C* гена *CCR3* у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и без таковой.

Выявлена положительная ассоциация аллеля *C* и генотипа *СС* (*T-51C*) гена *CCR3* в отношении развития эозинофильной реакции крови при ТЛ (и соответственно, протективный эффект генотипов *СТ*, *ТТ* и аллеля *T* полиморфизма *T-51C* гена *CCR3*).

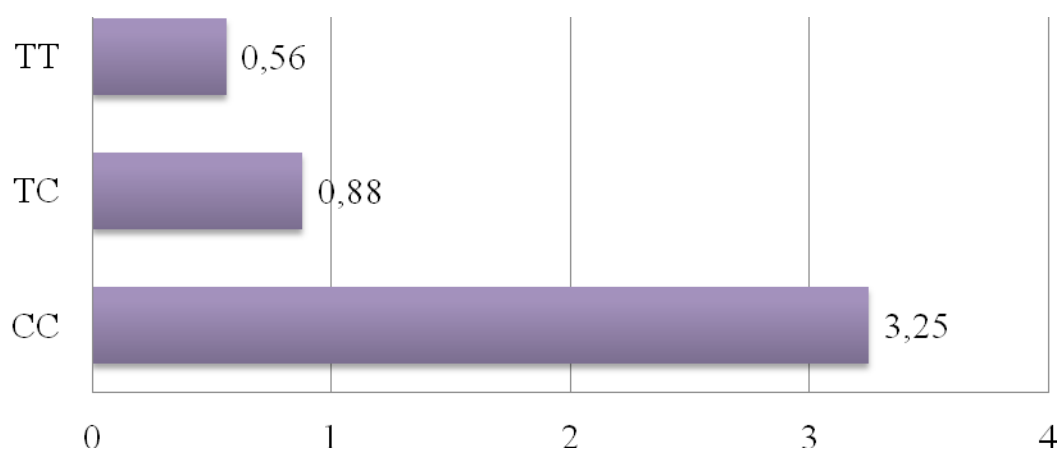


Рис. 4. Показатели относительного риска развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от генотипа полиморфного сайта *T-51C* гена *CCR3*. Слева генотипы полиморфного сайта *T-51C*, справа – критерий отношения шансов (OR)

Ген рецептора для эотаксина картирован на хромосоме 3p21 и состоит из 4 экзонов. Контроль транскрипции гена *CCR3* связан с промоторной областью, где расположены сайты связывания транскрипционных факторов GATA-1, PU-1 и C/EBP [Zimmermann N. et al., 2005]. Большинство сайтов связывания расположено в промоторах в районе  $[-1; -200]$  п.о. по

отношению к старту транскрипции. В то же время, функциональные сайты встречаются и в очень 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», становится понятно, что замена даже одного нуклеотида в области промотора гена ведет к изменению структуры сайтов связывания. Это, в конечном итоге, позволяет транскрипционным факторам приобретать большее или меньшее сродство к регуляторным участкам и в дальнейшем напрямую связано с уровнем транскрипции закодированного цитокина [Pedroza-Gonzalez A. et al., 2004].

Наряду с описанными выше результатами, у больных ТЛ независимо от содержания эозинофилов в периферической крови обнаруживалась тенденция к увеличению количества эозинофилов, экспрессирующих *CCR3*, среди носителей генотипа *CC* и снижение числа изучаемых клеток – среди носителей гомозиготного генотипа по аллелю *T* полиморфного сайта *T-51C* гена *CCR3* (табл. 15). Однако статически достоверных различий показано не было. Следовательно, аллельный полиморфизм *T-51C* гена *CCR3* не оказывает существенного влияния на уровень экспрессии рецептора к эотаксину. Описанные выше изменения количества эозинофилов, несущих рецептор к эотаксину, у больных ТЛ, по всей видимости, не связаны с исследуемым полиморфизмом гена *CCR3*.

Следует отметить, что сочетание у индивида «нормальных» аллелей генов цитокинов и их рецепторов по отдельности имеют слабый эффект, в то время как их совокупность приводит к формированию особенностей ответа макроорганизма на патоген, предрасполагающих к развитию определенных заболеваний [Симбирцев А. С., Громова А. Ю., 2005]. Это обусловлено полиморфностью системы цитокинов, их плеiotропным действием, а также тем, что конечный эффект на клетку формируется рядом медиаторов. В связи с этим, на сегодня приоритетным является изучение ассоциированности того

или иного заболевания с целым рядом аллельных вариантов генов цитокинов [Абрамов Д. Д. и соавт., 2011].

Исходя из вышеизложенного, нами был проведен анализ ассоциаций полиморфизма *C-703T* гена *IL-5* и *G-80A* гена *IL-5RA*, а также аллельных вариантов полиморфного сайта *A-384G* гена эотаксина и *T-51C* гена *CCR3* с риском развития эозинофилии при ТЛ.

В ходе проведенного исследования было показано, что наибольший риск развития эозинофилии при ТЛ ассоциирован с носительством гомозиготных генотипов *CC* (*C-703T*) гена *IL-5* и *AA* (*G-80A*) гена *IL-5RA* ( $OR=8,95$ ) (рис. 5). Данные генотипы ассоциированы с высоким уровнем продукции соответствующего цитокина и повышенной экспрессией его рецептора.

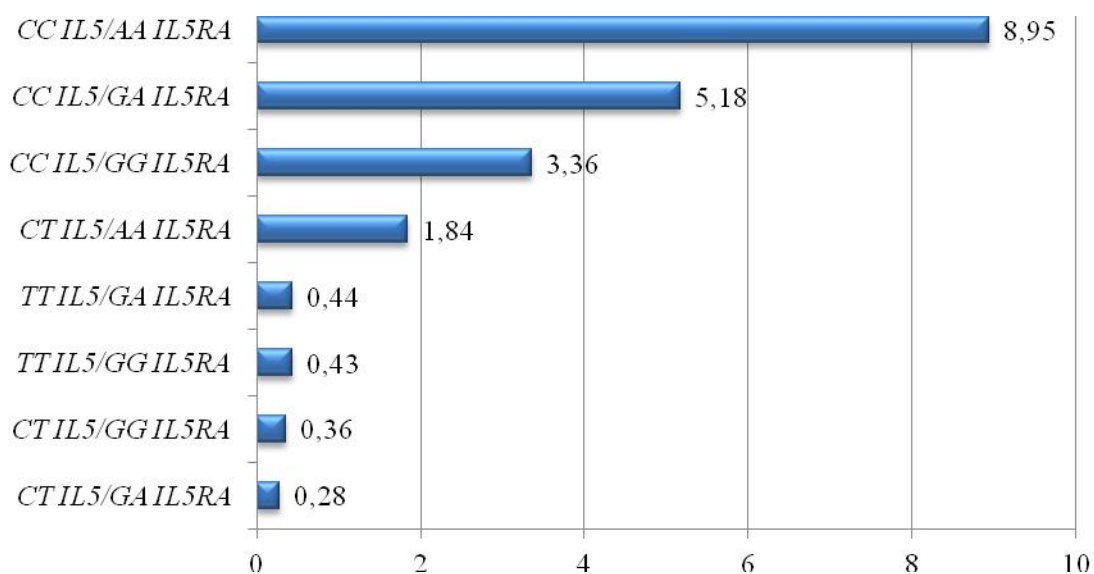


Рис. 5. Риск развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов *C-703T* гена *IL5* и *G-80A* гена *IL5RA*. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов и рецепторов, справа – критерий отношения шансов ( $OR$ )

Проведенный анализ сочетаний генов выявил также комбинации генотипов с выраженным 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 эозинофилии



эффектом (рис. 5). Риск развития (OR) эозинофилии для носителей данных предрасполагающих сочетаний генов увеличивался в диапазоне от 3 до 9 раз.

При изучении сочетаний генотипов полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3* с риском развития эозинофилии при ТЛ были выявлены три комбинации генов, обладающие протективным действием: *AA эотаксина/TT CCR3*, *AA эотаксина/TC CCR3*, *AG эотаксина/TC CCR3*, и четыре комбинации с предрасполагающим эффектом, т.е. увеличивающие риск развития эозинофилии при ТЛ: *AG эотаксина/TT CCR3*, *AA эотаксина/CC CCR3*, *AG эотаксина/CC CCR3*, *GG эотаксина/CC CCR3* (рис. 6).

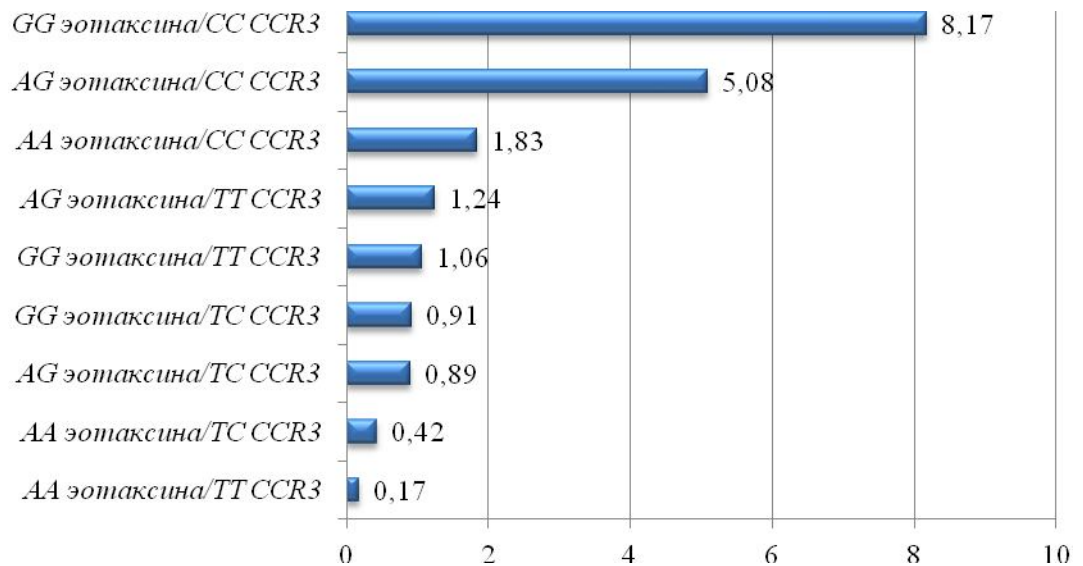


Рис. 6. Риск развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов *A-384G* гена *эотаксина* и *T-51C* гена *CCR3*. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов, справа – критерий отношения шансов (OR)

В связи с наличием ассоциации полиморфизма *C-703T* гена *IL-5* и аллельных вариантов полиморфного сайта *A-384G* гена *эотаксина* с продукцией соответствующих цитокинов нами было проанализировано сочетание генотипов полиморфизмов вышеназванных цитокинов с риском развития эозинофилии при ТЛ.

В ходе проведенного исследования было показано, что наибольший риск развития эозинофильной реакции крови при ТЛ ассоциирован с одновременным носительством генотипа *CC* (*C-703T*) гена *IL5* и генотипа *GG* (*A-384G*) гена *эотаксина* ( $OR=2,87$ ). Данные генотипы ассоциированы с высоким уровнем продукции соответствующих цитокинов.

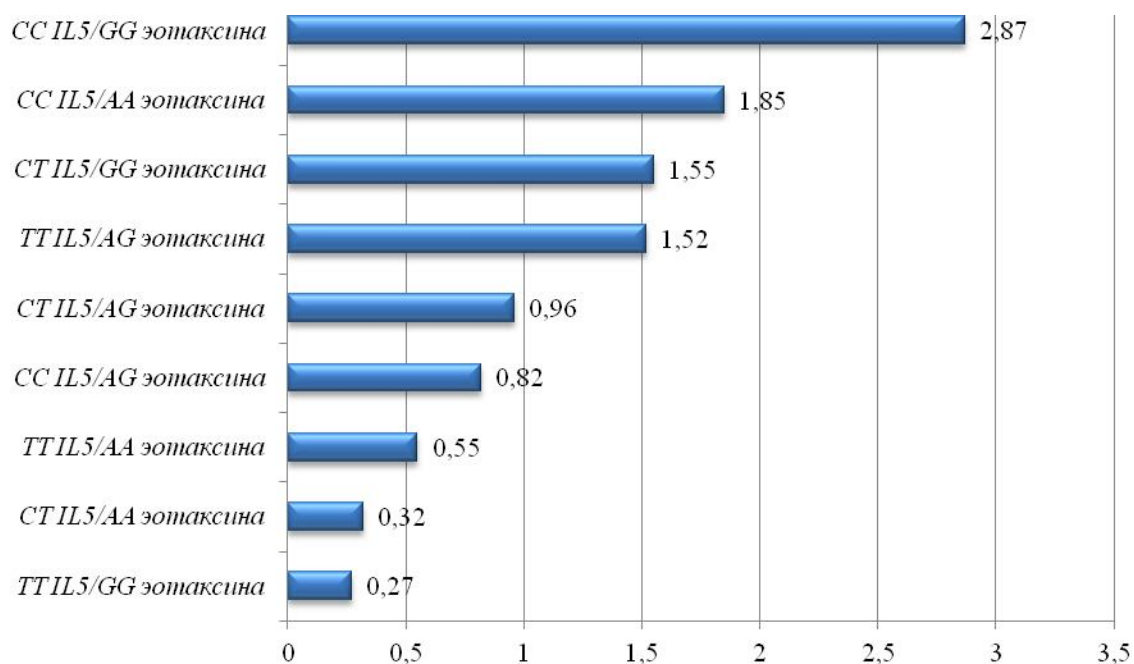


Рис. 7. Риск развития эозинофилии при туберкулезе легких в зависимости от ассоциации аллельных вариантов *C-703T* гена *IL5* и *A-384G* гена *эотаксина*. Слева сочетания генотипов полиморфных сайтов генов цитокинов, справа – критерий отношения шансов (*OR*)

Проведенный анализ сочетаний генов выявил также комбинации с выраженным протективным (*TT IL5/GG эотаксина*, *CT IL5/AA эотаксина*, *TT IL5/AA эотаксина*) эффектом (рис. 7). Интересным представляется тот факт, что такого рода протекция в отношении развития эозинофилии крови при туберкулезной инфекции обеспечивалась сочетанием генотипов *TT* полиморфизма *C-703T* гена *IL-5* с генотипом *GG* полиморфного участка *A-384G* гена *эотаксина* ( $OR=0,27$ ). Индивиды, несущие данные ассоциации генотипов, имели высокий уровень *эотаксина* и низкий уровень *IL-5* в крови.

По всей видимости, в условиях низкой концентрации IL-5 в крови эотаксин обладает более выраженными хемотаксическими свойствами, обуславливая миграцию эозинофилов в зону гранулематозного воспаления и низкое содержание их в крови у пациентов с ТЛ без эозинофилии.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что наследственно определенный высокий уровень ключевых факторов дифференцировки и рекрутирования эозинофильных гранулоцитов – IL-5 и эотаксина, а также рецепторов к ним, определяет формирование эозинофильной реакции крови у больных ТЛ, риск развития которой увеличивается при сочетании в геноме индивида нескольких высокопродуцирующих генотипов.

Следует отметить, что на сегодняшний день не существует единого мнения о целесообразности возникновения и значении эозинофильной реакции крови при туберкулезной инфекции. По данным одних авторов, умеренная эозинофилия при отсутствии сдвига влево в сочетании с лимфоцитозом сопровождает случаи благоприятно протекающего туберкулезного процесса, а гипозозинофилия и особенно анэозинофилия отмечаются при тяжелом состоянии больных и являются неблагоприятным прогностическим признаком [Мишин В. Ю. и соавт., 2004]. Другие авторы, напротив, утверждают, что эозинофильная реакция крови чаще встречается при деструктивных формах лекарственно-устойчивого туберкулеза легких, характеризующегося более тяжелым течением [Kirman J. et al., 2009].

Для уточнения влияния эозинофильной реакции крови на течение инфекционного процесса, вызванного *M. tuberculosis*, на втором этапе настоящего исследования была проведена сравнительная оценка отдельных параметров клеточного и гуморального звена иммунного ответа у больных ТЛ, сопровождающимся эозинофилией, и без эозинофилии.

Известно, что в целом иммунный статус больных ТЛ отличается выраженной депрессией клеточного звена иммунитета со снижением общего содержания лимфоцитов, Т-лимфоцитов, а также значительным угнетением их функциональной активности. Однако сам факт клинической

манифестации заболевания связывают с постепенным вовлечением в процесс элиминации антигена гуморального иммунного ответа [Welin A., Lerm M., 2012]. Ключевая роль в формировании клеточного иммунного ответа при туберкулезной инфекции отводится различным субпопуляциям Т-лимфоцитов:  $CD3^+$  Т-лимфоцитам,  $CD4^+$  Т-хелперам и  $CD8^+$  цитотоксическим Т-лимфоцитам [Лядова И. В. и соавт., 2009].

Для оценки клеточного звена иммунитета у больных ТЛ было проведено исследование общего количества лимфоцитов и содержания клеток, несущих общий популяционный маркер Т-лимфоцитов –  $CD3$ .

Как показали результаты проведенного исследования, абсолютное содержание лимфоцитов у больных ТЛ без эозинофилии и ДТЛ с эозинофилией значимо не отличалось от контрольных значений, а у больных ИТЛ, сопровождающимся эозинофилией, достоверно увеличивалось (табл. 16). При изучении субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у больных ДТЛ независимо от количества эозинофильных лейкоцитов периферической крови было зарегистрировано статистически значимое снижение (по сравнению с контрольными значениями) относительного и абсолютного числа  $CD3^+$  Т-лимфоцитов (табл. 16). Полученные данные согласуются с результатами других исследователей, согласно которым диссеминированный вариант ТЛ характеризуется более выраженными изменениями клеточного звена иммунного ответа [Воронкова О.В. и соавт., 2007; Лядова И.В., Гергерт В.Я., 2009].

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

продукции цитокинов.

Ключевым цитокином, обеспечивающим протекцию при туберкулезной инфекции, является IFN- $\gamma$ , обладающий способностью повышать антигенпрезентирующую функцию макрофагов и усиливать цитотоксические реакции, опосредованные Т-лимфоцитами и NK-клетками [Салина Т. Ю. и соавт., 2012]. IFN- $\gamma$  играет ведущую роль в генезе индуцированной туберкулезным антигеном в ткани легкого гранулемы посредством экспрессии адгезивных молекул и хемокинов, необходимых для рекрутирования моноцитов/ макрофагов в очаг воспаления [Воронкова О. В. и соавт., 2007]. Многочисленными экспериментальными исследованиями было показано, что недостаточная продукция IFN- $\gamma$  ведет к неспособности организма ограничивать рост и размножение внутриклеточных микобактерий, и заболевание протекает тяжело, нередко с осложнениями и имеет неблагоприятный исход. В то же время более высокий уровень спонтанной и индуцированной продукции IFN- $\gamma$  предопределяет и более благоприятный исход туберкулезного процесса [Салина Т. Ю., Морозова Т. И., 2012].

В результате экспериментальных исследований накоплены весьма противоречивые сведения о синтезе IFN- $\gamma$  при ТЛ. По мнению одних исследователей, течение ТЛ сопровождается угнетением продукции IFN- $\gamma$ . При этом более значительное подавление продукции данного цитокина обнаруживается у лиц с тяжелым течением ТЛ. Экспериментальными исследованиями было показано, что недостаточная продукция IFN- $\gamma$  ведет к неспособности организма ограничивать рост и размножение внутриклеточных микобактерий, и заболевание протекает тяжело, нередко с осложнениями, имеет неблагоприятный исход. В работах ряда других авторов продемонстрировано достоверное увеличение содержания IFN- $\gamma$  в крови у больных ТЛ, особенно при благоприятном течении процесса [Новицкий В. В. и соавт., 2005; Шкарин А. В. и соавт., 2008; Салина Т. Ю., Морозова Т. И., 2012].

В ходе проведенного исследования было зарегистрировано статистически значимое снижение концентрации IFN- $\gamma$  в крови у больных ТЛ, ассоциированным с эозинофильной реакцией (табл. 17), и найдена отрицательная корреляция между количеством IFN- $\gamma$  и эозинофильных гранулоцитов в крови ( $r=-0,731$ ,  $p<0,05$ ). Это, вероятно, обусловлено преобладанием иммунорегуляторных цитокинов, опосредующих формирование гуморального иммунитета, подавляющих пролиферацию Th1-лимфоцитов и их способность секретировать основные противотуберкулезные медиаторы. Следует отметить, что дефицит IFN- $\gamma$  может выступать в качестве фактора, способствующего развитию эозинофилии в крови и тканях при туберкулезе легких. Так, J. Kirman et al. [2000] показали, что при заражении живым аттенуированным штаммом *M. bovis* мышей с нокаутом гена IFN- $\gamma$  (неспособных продуцировать IFN- $\gamma$  или экспрессировать специфический рецептор) отмечались увеличение количества эозинофилов в периферической крови и инфильтрация ими 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, исследователи наблюдали явление повышенной восприимчивости экспериментальных животных к росту микобактерий, полагая, что именно эозинофилия и эозинофилы вносят свой негативный вклад в этот процесс.

В комплексе защитных реакций при ТЛ немаловажную роль играют механизмы гуморального иммунного ответа, хотя некоторые авторы указывают на то, что антитела, вырабатываемые В-лимфоцитами, лишены протективности и, таким образом, полностью исключают их роль в патогенезе туберкулезного воспаления. Функция В-лимфоцитов достаточно значима уже при первичном проникновении *M. tuberculosis* в организм человека. Синтезируемые антитела нейтрализуют токсины, опсонизируют бактерии, связывают антиген, участвуют в процессах антителозависимой клеточной цитотоксичности [Аутеншлюс А. И. и соавт., 2004]. Кроме того, В-

лимфоциты способны продуцировать широкий спектр цитокинов, таких как IL-1, IL-4, IL-6, IL-12 и TGF- $\alpha$ , создавая свой собственный медиаторный фон [Воронкова О. В. и соавт., 2007].

Молекулы CD20<sup>+</sup> представлены практически на всех клетках В-онтогенетического ряда от пре-В-лимфоцитов до плазматических клеток [Чередеев А.Н., 1999]. В ходе настоящей работы у больных ТЛ с эозинофильной реакцией было установлено статистически значимое повышение абсолютного числа CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов и найдена положительная корреляция между их содержанием и количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической крови ( $r=0,620$ ,  $p<0,05$ ) (табл. 16). Полученные нами данные согласуются с результатами других работ, указывающих на то, что течение туберкулезной инфекции сопровождается увеличением в крови количества и активацией 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., Lerm M., 2012]. Выраженные изменения содержания CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов именно у больных ТЛ с эозинофилией могут быть обусловлены влиянием IL-5, уровень которого в крови у данной группы пациентов оказался достоверно выше такового у больных без эозинофилии. Этот эффект опосредован способностью IL-5 влиять не только на эозинофилы, но и 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 (Ig), главным образом IgA.

## Заключение

Подводя итог полученным результатам, следует заключить, что эозинофильная реакция крови при ТЛ носит реактивный характер, механизм формирования которой опосредован гиперсекрецией клетками крови ключевых эозинофил-активирующих медиаторов (IL-5 и эотаксина), а также избыточной экспрессией IL-5RA на мембране эозинофильных гранулоцитов. Носительство генотипов *CC* полиморфного участка *C-703T* гена *IL5* и *GG* полиморфизма *A-384G* гена *эотаксина*, ассоциированных с гиперпродукцией IL-5 и эотаксина и повышением их содержания в крови, является определяющим фактором в формировании гемической эозинофилии при ТЛ. Таким образом, установлен факт генетической предрасположенности к развитию эозинофилии крови при туберкулезной инфекции (рис. 8).

При изучении влияния эозинофилии на состояние противотуберкулезного иммунитета показано, что туберкулезная инфекция в сочетании с эозинофильной реакцией крови характеризуется нарушениями субпопуляционного состава лимфоцитов (с увеличением числа CD20<sup>+</sup> В-лимфоцитов в крови), а также дисбалансом цитокинов, опосредующих формирование Th1- и Th2-иммунного ответа (в том числе уменьшением концентрации IFN- $\gamma$  в крови – ключевого противотуберкулезного цитокина). Преобладание активности гуморальных реакций при ТЛ, ассоциированном с эозинофилией крови, можно рассматривать как один из прогностически неблагоприятных факторов иммунопатогенеза основного заболевания и фактора способствующего дальнейшему развитию эозинофилии крови при туберкулезной инфекции. В целом, полученные в настоящем исследовании результаты существенно расширяют представления о механизмах развития эозинофилии крови при ТЛ и могут явиться основой для разработки критериев прогноза течения и иммунотерапии данной патологии.



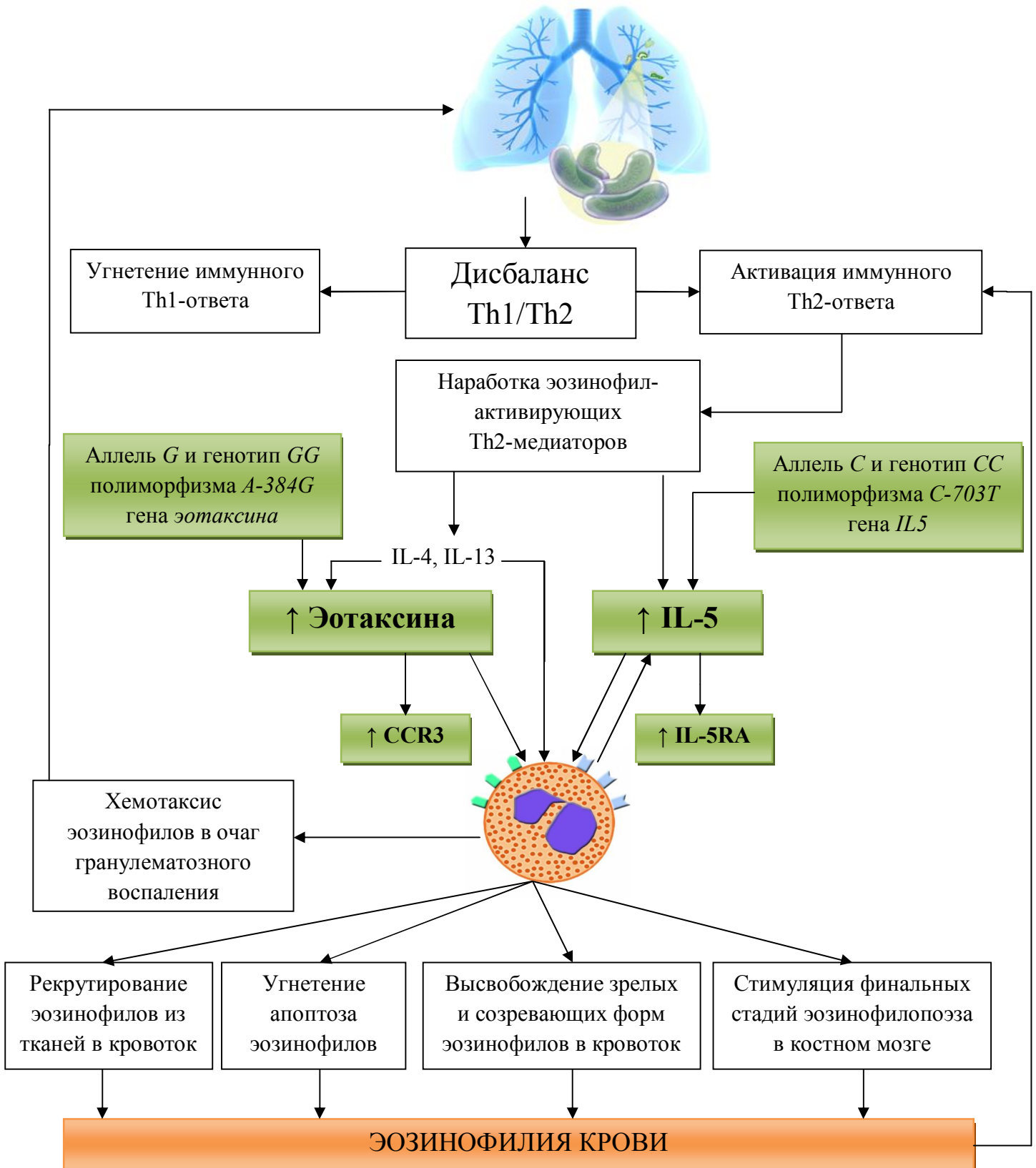


Рис. 8. Молекулярно-генетические механизмы развития эозинофилии при туберкулезе легких (по данным О. В. Воронковой и соавт., 2007; И. В. Лядовой, В. Я. Гергерт, 2009; М. Е. Rothenberg et al., 2007; Н. F. Rosenberg et al., 2009; R. Shamri et al., 2010 и результатам собственных исследований (выделено зеленым цветом))

## ВЫВОДЫ

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

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абрамов, Д. Д. 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.
2. Анаев, Э. Х. Эозинофилы и эозинофилии / Э. Х. Анаев // Пульмонология и аллергология. - 2002. - № 3. - С. 15-18.
3. 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.
4. Антигенпрезентирующие клетки при туберкулезе легких / Л. В. Сахно, Е. Р. Черных // Туберкулез и болезни легких. – 2012. – № 1. – С. 3-9.
5. Атлас по медицинской микробиологии и вирусологии / под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. - М., 2003. – 205 с.
6. Аутеншлюс, А. И. Антитела к антигенам микобактерий у больных туберкулезом легких / А. И. Аутеншлюс, Ю. В. Туманов, А. Н. Шкунов и др. // Проблемы туберкулеза. – 2004. – № 11. – С. 37-40.
7. Аутеншлюс, А. И. Содержание цитокинов IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  и уровни антител к TNF $\alpha$  у больных с онкологическими и воспалительными заболеваниями / А. И. Аутеншлюс, А. Н. Шкунов, Г. Г. Иванова и др. // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 11-15.
8. Богун, А. Г. 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.
9. Боровиков, В. В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В. В. Боровиков. – СПб., М., Харьков., Минск, 2001. – 360 с.

10. Воронкова, О. В. Иммунопатология туберкулеза легких / О. В. Воронкова, О. И. Уразова, В. В. Новицкий, А. К. Стрелис – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – 194 с.
11. Воронько, О. Е. 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. 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.
13. Гемограмма и показатели специфического иммунитета у больных туберкулезом детей / Е. Ю. Зоркальцева // Клиническая медицина. – 2005. – Т. 1, № 39. – С. 35-39.
14. 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.
15. Гергерт, В. Я. Цитокины при туберкулезе / В. Я. Гергерт, М. М. Авербах, Г. Г. Космиади и др. // Вестник РАМН. – 1995. - № 7. – С. 33-38.
16. Гиперэозинофильный синдром с поражением пищевода, желудка и тонкой кишки / О. М. Михеева, М. В. Кирова, Л. И. Ефремов и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 8. – С. 104-112.
17. Гончарова, И. А. Геномные основы подверженности к инфекционным заболеваниям / И. А. Гончарова, М. Б. Фрейдин, А. А. Рудко и др. // Вестник ВОГиС. – 2006. – Т.10, №3. – С. 540-552.
18. Динамика показателя распространенности туберкулеза и анализ контингентов противотуберкулезных учреждений Иркутской области за период 2000-2009 годов / Н. С. Хантаева // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 96-98.

19. Имангулова, М. М. Молекулярно-генетические аспекты туберкулеза легких / М. М. Имангулова, А. С. Карунас, Э. К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. – 2005. – Т. 4, № 11. – С. 505-510.
20. Инфекция и иммунитет: стратегии обеих сторон / Г. Ф. Железникова // Медицинская иммунология. – 2006. – Т. 8, № 5-6. – С. 597-614.
21. Калмыкова, Е. В. Исследование ассоциаций полиморфных маркеров генов интерлейкинов с хроническим гломерулонефритом: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. В. Калмыкова. – Москва, 2009. – 19 с.
22. Клональные эозинофилии / Н. Б. Михайлова, Б. В. Афанасьев // Клиническая онкогематология. – 2009. – Т. 2, № 1. – С. 1-10.
23. Ковальчук, Л. В. Система цитокинов / Л. В. Ковальчук – М., 1999. – 74 с.
24. Корецкая, Н. М. Современные взгляды на вакцинацию БЦЖ / Н. М. Корецкая // Сибирское медицинское обозрение. – 2011. – Т. 67, № 1. – С. 3-8.
25. Кошечкин, В.А. Туберкулёз: Учебное пособие. / В.А. Кошечкин, З.А. Иванова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 304 с.
26. Лекарственная аллергия / Е. В. Колодийчук, Е. В. Грудина, Т. Е. Малашенкова // Медицинский Вестник Северного Кавказа. – 2007. – № 2. – С. 70-75.
27. Литвинова, Л. С. Клеточные механизмы больших эозинофилий крови / Л. С. Литвинова, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – 133 с.
28. Мишин, В.Ю. Фтизиопульмонология: Учебник / В.Ю. Мишин, Ю.Г. Григорьев, А.В. Митронин и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 504с.
29. 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.

30. Мордвинов, В. А. Цитокины: биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина-5 человека / В. А. Мордвинов, Д. П. Фурман // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т.13, №1. – С. 53-67.

31. Новицкий, В. В. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне химиотерапии / В. В. Новицкий, В. А. Сеницына, О. В. Воронкова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2005. – № 6. – С. 39-42.

32. Новицкий, В. В. Цитогенетический статус лимфоцитов периферической крови при туберкулезе легких до лечения и на фоне химиотерапии / В. В. Новицкий, А. К. Стрелис, О. И. Уразова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2005. – № 5. – С. 43-46.

33. Особенности продукции интерферона  $\gamma$  при туберкулезе легких / Т. Ю. Салина, Т. В. Морозова // Цитокины и воспаление. – 2012. - № 1. – С. 96-100.

34. 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.

35. Павлов, В. А. 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.

36. Перельман, М.И. Основные итоги противотуберкулезной работы в России в 2001 г. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2003. – № 2. – С. 3-11.

37. 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.

38. Ризванова, Ф. Ф. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов / Ф. Ф. Ризванова, О. И. Пикуза, Р. А. Файзуллина и др. // Практическая медицина. – 2010. – № 6(45). – С. 41-43.

39. 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.

40. Салина, Т. Ю. Особенности продукции фактора некроза опухоли  $\alpha$  при туберкулезе легких и внелегочных локализаций / Т.Ю. Салина, Т.И. Морозова // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9, № 1. – С. 45-48.

41. Свирщевская, Е. В. Иммуитет при туберкулезе и аспергиллезе / Е. В. Свирщевская, В. С. Митрофанов, Р. И. Шендерова, Н. М. Чужова // Проблемы медицинской микологии. – 2005. – Т.7, № 1. – С. 3-13.

42. Симбирцев, А. С. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления / А. С. Симбирцев, А. Ю. Громова // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 3-10.

43. Симбирцев, А. С. Цитокины: классификация и биологические функции / А. С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 16-21.

44. Туберкулез: этиология и характеристика форм и структурных изменений, вызванных различными генотипами микобактерий / В. В. Свистунов // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 106, № 6. – С. 114-117.

45. Туберкулезная гранулема. Современный взгляд на иммуногенез и клеточный состав / М. М. Авербах // Туберкулез и болезни легких. – 2010. – Т. 87, № 6. – С. 3-9.

46. Фрейдин, М. Б. 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.

47. Фрейдин, М. Б. 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.
48. Фтизиатрия / М. И. Перельман, В. А. Корякин, И. В. Богадельникова. - М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2007. - 512 с.
49. Хаитов, Р. М. Физиология иммунной системы / Р. М. Хаитов. – М: ВИНТИ РАН, 2001. – 223 с.
50. Цыган, В. Н. 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.
51. Частота и патогенез неблагоприятных побочных реакций на противотуберкулезные препараты / А. В. Мордык // Вестник Современной Клинической медицины. – 2010. – Т. 3, № 1. – С. 16-21.
52. Чередеев, А. Н. CD-маркеры в практике клинко-диагностических лабораторий / А. Н. Чередеев, Н. К. Горлина, И. Г. Козлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 6. – С. 25-32.
53. Чурина, Е. Г. 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. Колбовникова // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – № 4. – С. 183-186.
54. Шевченко, А. В. Особенности полиморфизма промоторных регионов генов цитокинов *IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10* и *TNFA* европеоидного населения Западной Сибири / А. В. Шевченко, О. В. Голованова, В. И. Коненков. // Иммунология. – 2010. – Т. 1, № 4. – С. 176-181.
55. Шилова, М. В. Распространенность туберкулеза в Российской Федерации и в мире / М. В. Шилова // Медицинский алфавит. – 2012. – Т. 1, № 3. – С. 5-10.



56. Шкарин, А. В. Уровень цитокинов в плазме крови у больных активным инфильтративным туберкулезом легких / А. В. Шкарин, С. С. Белоусов, О. А. Аникина // Проблемы туберкулеза и болезней лёгких. – 2008. – № 8. – С. 34-38.
57. Шкурупий, В. А. Туберкулезный гранулематоз. Цитофизиология и адресная терапия / В. А. Шкурупий. – М.: Изд-во РАМН, 2007. – 536 с.
58. Шовкун, Л. А. Особенности иммунного статуса у больных с впервые выявленным инфильтративным туберкулезом легких и рецидивом заболевания / Л. А. Шовкун, Н. Э. Романцева, А. В. Константинова и др. // Цитокины и воспаление. – 2010. – № 4. – С. 152-153.
59. Эозинофильный бронхит / Б. А. Черняк, И. И. Воржева. // Пульмонология и аллергология. – 2011. – №2. – С. 2-4.
60. Эпидемиология, патогенез и патоморфология остро прогрессирующего туберкулеза легких / Н. М. Корецкая // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – № 2. – С. 5-8.
61. Эпидемиология, течение и особенности лечения туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией / Медицина в Кузбассе. – 2011. – Т. 10, № 3. – С. 6-13.
62. Ahrens, R. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/Eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis / R. Ahrens, A. Waddell, L. Seidu et al. // J. Immunol. – 2008. – Vol. 181(10). – P. 7390–7399.
63. 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. // Ann Saudi Med. – 2010. – Vol. 30 (2). – P. 115–122.
64. Atasoy, U. Regulation of eotaxin gene expression by TNF- $\alpha$  and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR / U. Atasoy, S. L. Curry, I. L. de Silanes et al. // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 171. – P. 4369-4378.

65. Attab, K. A. 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. // *International Journal of Integrative Biology*. – 2008. – Vol. 4, № 2. – P. 86-91.
66. Banerjee, S. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria / S. Banerjee, A. Farhana, N. Z. Ehtesham et al. // *Infect Genet Evol*. – 2011. – Vol. 11 (5). – P. 825–838.
67. Bischoff, S. C. Role of Mast Cells and Eosinophils in neuroimmune interactions regulating mucosal inflammation in inflammatory bowel disease / S. C. Bischoff, T. Gebhardt. // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2006. – Vol. 579. – P. 177-208.
68. Blom, K. 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.
69. Bugeja, M. J. 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. // *Medical Genetics*. – 2006. – Vol. 7, № 64. – P. 1-12.
70. Bullock, J. Z. 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. // *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. – 2007. – Vol. 45. – P. 22-31.
71. Campos, L. E. M. Pulmonary eosinophilia / L. E. M. Campos, L. F. F. Pereira. // *J. bras. pneumol*. – 2009. – Vol. 35, № 6. – P. 125-132.
72. Cavalcanti, Y. V. N. 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. // *Pulmonary Medicine*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-10.
73. Chen, J. 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.

74. Chen, Y. Cytokine polymorphisms in Th1/Th2 pathway genes, body mass index, and risk of non-Hodgkin lymphoma / Y. Chen, T. Zheng, Q. Lan et al. // *Blood*. – 2011. – Vol.117, № 2. – P. 585-590.
75. Cherry B. W. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils / W. B. Cherry, J. Yoon, K. R. Bartemes et al. // *J Allergy Clin. Immunol.* – 2008. – Vol. 121, № 6. – P. 1484-1490.
76. Criado, P. R. Drug reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) / Drug-induced Hypersensitivity Syndrome (DIHS): a review of current concepts / P. R. Criado, R. F. Criado, Avancini J. M. et al. // *An Bras Dermatol.* – 2012. – Vol. 87(3). – P. 435-449.
77. Cook, E. B. IL-3 and TNF $\alpha$  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. // *Clin Mol Allergy*. – 2012. – Vol. 10 (8). – P. 1-9.
78. D'Avila, H. Toll-Like Receptor-2-Mediated C-C Chemokine Receptor 3 and Eotaxin-Driven Eosinophil Influx Induced by *Mycobacterium bovis* BCG Pleurisy / H. D'Avila, P. E. Almeida, N. R. Roque et al. // *Infect Immun.* – 2007. – Vol. 75(3). – P.1507-1511.
79. DeBrosse, C. W. Allergy and eosinophil-associated gastrointestinal disorders / Charles W. DeBrosse, Mark E. Rothenberg // *Current Opinion in Immunology*. – 2008. – Vol. 20. – P. 703-708.
80. Dent, G. Contribution of Eotaxin-1 to Eosinophil Chemotactic Activity of Moderate and Severe Asthmatic Sputum / G. Dent, C. Hadjicharalambous, T. Yoshikawa et al. // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2004. – Vol. 169. – P. 1110-1117.
81. Dolgachev, V. Eosinophil Activation of fibroblasts from chronic allergen-induced disease utilizes stem cell factor / V. Dolgachev, A. A. Berlin, N. W. Lukacs // *The American Journal of Pathology*. – 2008. – Vol. 172, № 1. – P. 68-76.

82. Driss, V. TLR-2-dependent eosinophil interactions with mycobacteria: role of alpha-defensins / V. Driss, F. Legrand, E. Hermann et al. // *Blood* - 2009. – Vol. 113. – P. 3235-3244.
83. Ellis, M. K. 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. // *The Journal of Immunology*. – 2007. – Vol. 179. – P. 8366-8371.
84. Endo, Y. 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.
85. Fang, Y. Eosinophils infiltrate thyroids, but have no apparent role in induction or resolution of experimental autoimmune thyroiditis in interferon-gamma(-/-) mice / Y. Fang, K. Chen, D. A. Jackson et al. // *Immunology*. – 2010. – Vol. 129(3). – P. 329-337.
86. Fischer, R. 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. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – Vol. 357(1). – P. 44-49.
87. Fukunaga, K. 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.
88. Fukushima, Y. Molecular cloning of chicken interleukin-5 receptor  $\alpha$ -chain and analysis of its binding specificity / Y. Fukushima, T. Miyai, M. Kumagae et al. // *Dev Comp Immunol*. – 2012. – Vol. 37 (3-4). – P. 354-362.
89. Gunter, M. J. Inflammation-related gene polymorphisms and colorectal adenoma / M. J. Gunter, F. Canzian, S. Landi et al. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2006. – Vol. 15. – P. 1126-1131.

90. Greter, M. GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells / M. Greter, J. Helft, A. Chow et al. // *Immunity*. – 2012. – Vol. 36(6). – P. 1031-1046.
91. 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.
92. Hellier, S. 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. // *Hepatology*. – 2003. – Vol. 38, №6. – P. 1468-1476.
93. Hercus, T. R. The GM-CSF receptor family: mechanism of activation and implications for disease / T. R. Hercus, S. E. Broughton, P. G. Ekert et al. // *Growth Factors*. – 2012. – Vol. 30 (2). – P. 63-75.
94. Hoffjan, S. Genetic variation in immunoregulatory pathways and atopic phenotypes in infancy / S. Hoffjan, I. Ostrovnaja, D. Nicolae et al. // *J Allergy Clin Immunology*. – 2004. – Vol. 113, №3. – P. 511-518.
95. Hong, S.-J. IL-5 and thromboxane A<sub>2</sub> 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.
96. Huaux, F. 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. // *The American Journal of Pathology*. – 2005. – Vol. 167, № 6. – P. 1485-1496.
97. Inoue, N. 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. // *Clinical & Experimental Immunology*. – 2011. – Vol. 163, № 3. – P. 318-323.

98. 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 // *Cytokine*. – 2008. – Vol. 42(2). – P.179-190.
99. Jacobsen, E. A. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? / E. A. Jacobsen, A. G. Taranova, N. A. Lee et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol. 119. – P. 1313-1320.
100. Jean-Baptiste, S. Expression of eotaxin, an eosinophil-selective chemokine, parallels eosinophil accumulation in the vesiculobullous stage of incontinentia pigmenti / S. Jean-Baptiste, E. A. O'Toole, M. Chen et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2002. – № 127. – P. 470–478.
101. 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.
102. 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. // *Cytokine*. – 2004. – Vol. 27, № 6. – P. 135-141.
103. Kabesch, M. Polymorphisms in eosinophil pathway genes, asthma and atopy / M. Kabesch, M. Depner, I. Dahmen et al. // *Allergy*. – 2007. – Vol.62 – P. 423–428.
104. Kato, E. Case of tuberculous pleurisy with eosinophilic pleural effusion and hematological eosinophilia / E. Kato, N. Yamada, T. Sugiura. // *Kekkaku*. – 2007. – Vol. 82(5). – P. 481-485.
105. Keller, C. Genetically determined susceptibility to tuberculosis in mice causally involves accelerated and enhanced recruitment of granulocytes / C. Keller, R. Hoffmann, R. Lang et al. // *Infection and Immunity*. – 2006. – Vol. 74, № 7. – P. 4295–4309.
106. 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 // *Infect Immun.* – 2009. – Vol. 68(5). – P. 2976-2978.

107. Kouro, T. IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy / T. Kouro, K. Takatsu. // *International Immunology*. – 2009. – Vol. 21, № 12. – P. 1303–1309.
108. Kumar, D. Regulation between survival, persistence, and elimination of intracellular mycobacteria: a nested equilibrium of delicate balances / D. Kumar, K. V. Rao // *Microbes Infect.* – 2011. – Vol. 13(2). – P. 121–133.
109. Kumar, M. Breast tuberculosis in immunocompetent patients at tertiary care center: A case series / M. Kumar, G. Chang, V. L. Naq et al. // *J Res Med Sci.* – 2012. – Vol. 17(2). – P. 199–202.
110. Kusano, S. Structural basis of interleukin-5 dimer recognition by its  $\alpha$  receptor / S. Kusano, N. Kukimoto-Niino, N. Hino // *Protein Sci.* – 2012. – Vol. 21(6). – P. 850-864.
111. 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 et al. // *Infection and Immunity*. – 2004. – Vol. 72, № 2. – P. 1147-1149.
112. Lee, J. J. Eosinophils In Health and Disease: The LIAR Hypothesis / J. J. Lee, E. A. Jacobsen, M. P. McGarry et al. // *Clin. Exp. Allergy*. – 2010. – Vol. 40(4). – P.563-575.
113. Lee, J. H. Drug rash with eosinophilia and systemic symptoms (DRESS) syndrome induced by celecoxib and anti-tuberculosis drugs / J. H. Lee, H. K. Park, J. Heo et al. // *J. Korean Med. Sci.* – 2008. – Vol. 23(3). – P. 521-525.
114. Lee, J.-H. Genetic effect of *CCR3* and *IL5RA* gene polymorphisms on eosinophilia in asthmatic patients / J.-H. Lee, H. S. Chang, G. H. Kim et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – Vol.120 (5). – P. 1110-1117.
115. 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. Woerly et al. // *Plos ONE*. - 2009. – Vol. 4 (6). – P. 1-9.
116. Lewis, T. C. Nasal cytokine responses to natural colds in asthmatic children / T. C. Lewis, T. A. Henderson, A. R. Carpenter et al. // *Clin Exp Allergy*. – 2012. – Vol. 42(12). – P. 1734-1744.

117. Lianes, E. Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes / E. Lianes, J. Quiralte, E. Lopez et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 2009. – Vol. 148(3). – P. 228-238.

118. Li, H. Highly up-regulated CXCR3 expression on eosinophils in mice infected with *Schistosoma japonicum* / H. Li, H. Chunsong, C. Guobin et al. // *Immunology.* – 2004. – Vol. 111. – P. 107-117.

119. Li, Z. The extracellular matrix protein mindin regulates trafficking of murine eosinophils into the airspace / Z. Li, S. Garantziotis, W. Jia et al. // *J. Leukoc. Biol.* – 2009. – Vol. 85(1). – P. 124-131.

120. Lida, A. 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.

121. 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. // *BMC Pulmonary Medicine.* – 2008. – Vol. 8:13. – P. 1-11.

122. Liu, X.-Q. *IL5RA* and *TNFRSF6B* gene variants are associated with sporadic IgA nephropathy / X.-Q. Liu, A. D. Paterson, N. He // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2008. – Vol. 19. – P. 1025-1033.

123. Lopez-Maderuelo, D. Interferon- $\gamma$  and Interleukin-10 gene polymorphisms in pulmonary tuberculosis / D. Lopez-Maderuelo, F. Arnalich, R. Serantes et al. // *American Journal of Respiratory and critical care medicine.* – 2003. – Vol. 167. – P. 970-975.

124. Mahajan, R. 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.

125. Mai, J. Th17 cells interplay with Foxp3<sup>+</sup> Tregs in regulation of inflammation and autoimmunity / J. Mai, H. Wang, X. F. Yang. // *Front Biosci.* – 2010. – Vol. 15. – P. 986-1006.



126. Manqieri, D. Eotaxin/CCL11 in idiopathic retroperitoneal fibrosis / D. Manqieri, D. Corradi, D. Martorana et al. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2012. – Vol. 27(10). – P. 3875-3884.
127. Manousou P. Increased expression of chemokine receptor CCR3 and its ligands in ulcerative colitis: the role of colonic epithelial cells in in vitro studies / P. Manousou, G. Kolios, V. Valatas et al. // *Clin. Exp. Immunol.* – 2010. – Vol. 162(2). – P. 337-347.
128. Marchand, E. Idiopathic chronic eosinophilic pneumonia / E. Marchand, J.-F. Cordier. // *Orphanet J. Rare Dis.* – 2006. – Vol. 1, № 11. – P. 1-11.
129. Marszalek, A. Traumatic ulcerative granuloma with stromal eosinophilia. A case report and short literature review / A. Marszalek, I. Neska-Dluqosz // *Pol J Pathol.* – 2011. Vol. 62(3). – P. 172-175.
130. Melo, R. C. N. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein (MBP) / R. C. N. Melo, L. A. Spencer, S. A. C. Perez et al. // *Lab Invest.* – 2010. – Vol. 89(7). – P. 769-781.
131. Mirza, S. The Ig-like domain of human GM-CSF receptor alpha plays a critical role in cytokine binding and receptor activation / S. Mirza, A. Walker, J. Chen et al. // *Biochem J.* – 2010. – Vol. 426(3). – P. 307-317.
132. Mirza, S. The role of interchain heterodisulfide formation in activation of the human common beta and mouse betaIL-3 receptors / S. Mirza, J. Chen, J. M. Murphy et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285(32). – P. 24759-24768.
133. Mirza, S. Two modes of beta-receptor recognition are mediated by distinct epitopes on mouse and human interleukin-3 / S. Mirza, J. Chen, B. Wen et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285(29). – P. 22370-22381.
134. Miyagaki, T 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.
135. Mori, Y. Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid

progenitor / Y. Mori, H. Iwasaki, K. Kohno et al. // *J. Exp. Med.* – 2009. – Vol. 206(1). – P. 183-193.

136. Morshed, M. Thymic stromal lymphopoietin stimulates the formation of eosinophil extracellular traps / M. Morshed, S. Yousefi, C. Stockle et al. // *Allergy.* – 2012. – Vol. 67 (9). – P. 1127-1137.

137. Mueller, T. Influence of interleukin 12B polymorphisms on spontaneous and treatment-induced recovery from hepatitis C virus infection / T. Mueller, A. Mas-Marques, C. Sarrazin et al. // *J. Hepatol.* – 2004. – Vol. 4. – P. 652-658.

138. Murphy, J. M. 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. // *Cytokine.* – 2008. – Vol. 42(2). – P. 234-242.

139. 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. // *Vitam Horm.* – 2006. Vol. 74. – P. 1-30.

140. Naka, I. Identification of a haplotype block in the 5q31 cytokine gene cluster associated with the susceptibility to severe malaria / I. Naka, N. Nishida, J. Patarapotikul et al. // *Malaria journal.* – 2009. – Vol. 8. – P. 1-6.

141. Nakamura, Y. TH2 cytokines and associated transcription factors as therapeutic targets in asthma / Y. Nakamura, M. Hoshino // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* – 2005. – Vol. 4. – P. 267-270.

142. 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 et al. // *Allergy.* – 2007. – Vol. 62. – P. 934-942.

143. Ozkara, S. K. Clinicopathologic significance of eosinophilic pleural effusions in a population with a high prevalence of tuberculosis and cancer / S. K. Ozkara, G. Turan, I. Basyigit // *Acta Cytol.* – 2007. – Vol. 51(5). – P. 773-781.

144. Palikhe, N. S. 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. // *Allergy Asthma Immunol. Res.* – 2010. – Vol. 2(2). – P.134-140.

145. Paplinska, M. Role of eotaxin in the pathophysiology of asthma / M. Paplinska, H. Grubek-Jaworska, R. Chazan // *Pneumonol. Alergol. Pol.* – 2007. – Vol. 75(2). – P.180-185.

146. Patino, E. Structure analysis of the IL-5 ligand-receptor complex reveals a wrench-like architecture for IL-5R $\alpha$  / E. Patino, A. Kotzsch, S. Saremba et al. // *Structure.* – 2011. - Vol. 19(12). – P.1864-1875.

147. Pease, J. E. Asthma, allergy and chemokines / J. E. Pease // *Curr. Drug Targets.* – 2006. – Vol. 7(1). – P. 3-12.

148. Pease, J. E. Chemokines and their receptors in allergic disease / J. E. Pease, T. J. Williams. // *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* – 2006. – Vol. 118, № 2. – P. 305-318.

149. Pedroza-Gonzalez, A. In situ analysis of lung antigen-presenting cells during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* / A. Pedroza-Gonzalez, G. S. Garcia-Romo, D. Aguilar-Leon et al. // *Int. J. Exp. Pathol.* – 2004 – Vol. 85(3). – P. 135-145.

150. Plessis, N. Acute helminth infection enhances early macrophage mediated control of mycobacterial infection / N. Plessis, L. Kleynhans, L. Thiart et al. // *Mucosal Immunol.* – 2012. – Vol. 36 (8). – P. 1-12.

151. Pullat, J. Optimization of candidate-gene SNP-genotyping by flexible oligonucleotide microarrays; analyzing variations in immunoregulator genes of hay-fever samples / J. Pullat, R. Fleischer, N. Becker et al. // *BMC Genomics.* – 2007. – Vol. 8:282. – P. 1-12.

152. Quesniaux, V. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria / V. Quesniaux, C. Fremond, M. Jacobs et al. // *Microbes Infect.* – 2004. – Vol. 6(10). – P. 946-959.

153. Raap, U. A new paradigm of eosinophil granulocytes: neuroimmune interactions / U. Raap, A. J. Wardlaw // *Experimental Dermatology* – 2008. – Vol. 17. – P. 731-738.

154. Ridruechai, C. Association analysis of susceptibility candidate region on chromosome 5q31 for tuberculosis / C. Ridruechai, S. Mahasirimongkol, J. Phromjai et al. // *Genes and Immunity*. – 2010. Vol. 11. – P. 416-422.
155. Rioux, J. D. 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.
156. Rohde, K. H. 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. // *Plos Pathogens*. – 2012. – Vol. 8(6). – P. 1-16.
157. Rosenberg, H. F. Eosinophils and their interactions with respiratory virus pathogens / H. F. Rosenberg, K. D. Dyer, J. B. Domachowske. // *Immunologi Research*. – 2009. – Vol. 43, № 1-3. – P. 128-137.
158. Rothenberg, M. E. Eosinophilic gastrointestinal disorders / M. E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 113, № 1. – P. 11-28.
159. Rothenberg, M. E. Eosinophils in the new millennium / M. E. Rothenberg // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – P. 1321-1322.
160. Rothenberg, M. E. The eosinophil / M. E. Rothenberg, S. P. Hogan // *Annu. Rev. Immunol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 147-174.
161. Ryan, A. W. Chromosome 5q candidate genes in coeliac disease: Genetic variation at *IL4*, *IL5*, *IL9*, *IL13*, *IL17B* and *NR3C1* / A.W. Ryan, J. M. Thornton, K. Brophy // *Tissue Antigens*. – 2005. – Vol. 65(2). – P. 150-155.
162. Salerno, M. S. Binding of octamer factors to the murine IL-5 CLE0 in primary T-cells and a T-cell line / M. S. Salerno, G. T. Schwenger, C. J. Sanderson et al. // *Cytokine*. – 2001. – Vol. 15. – P. 4-9.
163. Segovia-Juarez, J. L. Identifying control mechanisms of granuloma formation during *M. tuberculosis* infection using an agent-based model / J. L. Segovia-Juarez, S. Ganguli, D. Kirschner // *J. Theor. Biol.* – 2004. – Vol. 231(3). – P. 357-376.

164. Shamri, R. Eosinophils in innate immunity: an evolving story / R. Shamri, J. J. Xenakis, L. A. Spencer. // *Cell and Tissue Research*. – 2010. – Vol. 343, № 1. – P. 57-83.
165. Shin, H. D. Association of Eotaxin gene family with asthma and serum total IgE / H. D. Shin, L. H. Kim, B. L. Park et al. // *Human Molecular Genetics*. – 2003. – Vol. 12, №.11 – P. 1279–1285.
166. Simeone, R. Phagosomal Rupture by *Mycobacterium tuberculosis* Results in Toxicity and Host Cell Death / R. Simeone, A. Bobard, J. Lippman et al. // *Plos Pathogens*. . – 2012. – Vol. 8(2). – P. 1–13.
167. Simon, D. Eosinophilic disorders / D. Simon, H.-U. Simon // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2007. – P. 1291-1300.
168. Spencer, L. A. Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially / L. A. Spencer, C. T. Szela, S. A. C. Perez et al. // *J. Leukoc Biol.* – 2009. – Vol. 85 (1). – P. 117–123.
169. Sugawara, I. Rat neutrophils prevent the development of tuberculosis / I. Sugawara, T. Udagawa, H. Yamada // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72(3). – P. 1804-1806.
170. Takatsu, K. IL-5 and eosinophilia / K. Takatsu, H. Nakajima. // *Curr. Opin. Immunol.* – 2008. – Vol. 20(3). – P. 288-294.
171. Takatsu, K. Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases / K. Takatsu. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B, Phys. Biol. Sci.* – 2011. – Vol. 87(8). – P. 463-485.
172. Takatsu, K. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response / K. Takatsu, T. Kouro, Y. Nagai. // *Adv. Immunol.* – 2009. – Vol. 101. – P. 191-236.
173. Taramelli, D. Production of cytokines by alveolar and peritoneal macrophages stimulated by *Aspergillus fumigatus* conidia or hyphae / D. Taramelli, M. G. Malabarba, G. Sala et al. // *J. Med. Vet. Mycol.* – 1996. – Vol. 34(1). – P. 49-56.

174. Tedeschi, A. Serum eotaxin levels in patients with chronic spontaneous urticaria / A. Tedeschi, R. Asero, M. Lorini et al. // *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* – 2012. – Vol. 44(5). – P. 188-192.

175. Tedla, N. Activation of human eosinophils through leukocyte immunoglobulin-like receptor 7 / N. Tedla, C. Bandeira-Melo, P. Tassinari et al. // *PNAS.* – 2003. – Vol. 100, № 3. – P. 1174-1179.

176. Tsunemi, Y. 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 Dermatological Science.* – 2002. – P. 222-228.

177. Tsunemi, Y. Lack of association of CCR3 single nucleotide polymorphism with atopic dermatitis in Japanese population / Y. Tsunemi, T. Sekiya, H. Saeki et al. // *J. of Dermatological Science.* – 2003. – Vol. 33. – P. 130-133.

178. Wagsater, D. 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.

179. Wang, J. Eosinophilic inflammation: mechanisms regulating IL-5 transcription in human T lymphocytes / J. Wang, I. G. Young // *Allergy.* – 2007. – Vol. 62. – P. 1131-1138.

180. Wang, T.-N. The polymorphisms of Eotaxin 1 and CCR3 genes influence on serum IgE, Eotaxin levels and mild asthmatic children in Taiwan / T.-N. Wang, W. Chiang, H.-I. Tseng et al. // *Allergy.* – 2007. – Vol. 62. – P. 1125-1130.

181. Wang, Y. Independent predictive roles of eotaxin Ala23Thr, paraoxonase 2 Ser311Cys and  $\beta_3$ -adrenergic receptor Trp64Arg polymorphisms on cardiac disease in Type 2 Diabetes—an 8-year prospective cohort analysis of 1297 patients / Y. Wang, A. O. Y. Luk, R. C. W. Ma et al. // *Diabetic Medicine.* – 2010. – Vol. 27. – P. 376-383.

182. Welin, A. Inside or outside the phagosome? The controversy of the intracellular localization of *Mycobacterium tuberculosis* / A. Welin, M. Lerm // *Tuberculosis*. – 2012. – Vol. 92 (2). – P. 113-120.

183. Wise, E. L. 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.

184. 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.

185. Xu, Y. Y. 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.

186. Yamamoto, N. 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.

187. Yang, D. Eosinophil-derived neurotoxin acts as an alarmin to activate the TLR2 – MyD88 signal pathway in dendritic cells and enhances Th2 immune responses / De Yang, Qian Chen, Shao Bo Su et al. // *The Journal of Experimental Medicine.* – 2007. – P. 1-12.

188. Yousefi, S. Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease / S. Yousefi, D. Simon, H. U. Simon // *Curr Opin Immunol.* – 2012. – Vol. 24 (6). – P. 736-739.

189. Zafra, M. P. 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.

190. Zaks-Zilberman, M. Interleukin-5 Receptor Subunit oligomerization and rearrangement revealed by fluorescence resonance energy transfer imaging / M. Zaks-Zilberman, A. E. Harrington, T. Ishino et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283(19). – P. 13398–13406.

191. Zimmermann, N. Analysis of the CCR3 promoter reveals a regulatory region in exon 1 that binds GATA-1 / N. Zimmermann, J. L. Colyer, L. E. Koch et al. // *BMC Immunology*. – 2005. – Vol. 6(7). – P. 1-11.

192. Zhu, W. 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.