

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО АГЕНТСТВА ПО ЗДРАВООХРАНЕНИЮ  
И СОЦИАЛЬНОМУ РАЗВИТИЮ

На правах рукописи

Григорьева Екатерина Сергеевна

**Механизмы нарушения цитокинопосредованной  
регуляции апоптоза эозинофилов при больших  
эозинофилиях крови**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Научные руководители:  
доктор медицинских наук,  
профессор Рязанцева Н.В.

доктор медицинских наук,  
академик РАМН, профессор,  
Заслуженный деятель науки РФ  
Новицкий В.В.

Томск – 2007

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. ....	10
РОЛЬ НАРУШЕНИЯ АПОПТОЗА ЭОЗИНОФИЛОВ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ БОЛЬШИХ ЭОЗИНОФИЛИЙ КРОВИ.....	10
1.1. Причины развития «больших эозинофилий крови». Общие представления о структуре, свойствах и функциях эозинофильных лейкоцитов.....	10
1.2. Роль дисрегуляции апоптоза эозинофильных гранулоцитов в патогенезе эозинофилии.....	22
1.2.1. Молекулярные основы реализации апоптотической гибели клеток .....	25
1.2.2 Общие представления о цитокиноопосредованной регуляции апоптоза клеток .....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	48
2.1. Характеристика объекта исследования .....	48
2.1.1. Клиническая характеристика пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови .....	49
2.1.2. Клиническая характеристика больных описторхозом.....	50
2.2. Методы исследования .....	53
2.2.1. Определение содержания общего количества лейкоцитов, эозинофилов и лимфоцитов в крови .....	53
2.2.2. Выделение эозинофилов крови .....	53
2.2.3. Культивирование эозинофилов крови .....	55
2.2.4. Оценка апоптотической реакции эозинофилов крови методом проточной лазерной цитометрии.....	55
2.2.4.1. Регистрация апоптоза эозинофилов крови.....	55
2.2.4.2. Оценка апоптоза эозинофилов крови при лишении ростовых факторов .....	56
2.2.4.3. Оценка влияния рекомбинантных форм цитокинов (IL-5, IL-3 и eotaxin) на апоптотическую гибель эозинофильных гранулоцитов .....	56
2.2.5. Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови .....	57
2.2.6. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов .....	57
2.2.7. Определение содержания эозинофилтропных цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и eotaxin в сыворотке крови.....	58
2.2.8. Статистический анализ результатов исследования.....	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61

3.1. Количественные показатели лейкоцитарного звена крови у пациентов с заболеваниями, ассоциированными с эозинофилией крови .....	61
3.2. Особенности реализации апоптоза эозинофилов у больных с эозинофилиями.....	64
3.3. Особенности реализации цитокинопосредованного апоптоза эозинофилов у пациентов с заболеваниями, ассоциированными с эозинофилией крови.....	66
3.3.1. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях инкубации <i>in vitro</i> с r-IL-5.....	67
3.3.2. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях инкубации <i>in vitro</i> в среде с добавлением r-IL-3 .....	72
3.3.3. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях их инкубации <i>in vitro</i> в среде с добавлением r-eotaxin .....	77
3.3.4. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях их инкубации <i>in vitro</i> в бессывороточной среде.....	82
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	85
ВЫВОДЫ.....	110
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	111

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

РНК - рибонуклеиновая кислота

ФГА - фитогемагглютинин

CD – поверхностный кластер дифференцировки

CSF - колониестимулирующий фактор

FasL - Fas-лиганд

FasR - Fas-рецептор

FcεR, FcγR – рецепторы к Fc-фрагменту IgE, IgG

FITC - флюоресцеинизотиоцианат

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IFN - интерферон

Ig - иммуноглобулин

IL – интерлейкин

LTC<sub>4</sub> – лейкотриен C<sub>4</sub>

MCP- протеин-хемоаттрактант для моноцитов

M-CSF - макрофагальный колониестимулирующий фактор

NK – натуральные киллеры

PAF - фактор активации тромбоцитов

Pg - простагландин

Th – Т-хелпер

TNF - фактор некроза опухоли

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** К числу часто встречаемых в клинической практике гематологических синдромов относится большая эозинофилия крови. Широкий круг нозологий, сопровождаемых гиперэозинофилией [Анаев Э.Х., 2002; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Чучалин А.Г., 2003; Абдулкадыров К.М., 2006], а также формирование серьезных осложнений [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Озерецковская Н.Н., 2000; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Куропатенко М.В., Желенина Л.А., 2005] определяют необходимость изучения патогенеза эозинофилий.

В настоящее время известны лишь некоторые механизмы развития гиперэозинофилии при патологических процессах разного генеза: антителозависимый хемотаксис, развивающийся при паразитозах (IgE- или IgG-антитела); иммунный, опосредованный через IgE (наблюдается при аллергии); ответ на эозинофильный хемотаксический фактор, выделяемый некоторыми опухолями; собственно опухолевая эозинофилия - лейкоз [Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998]. К числу общих для разных нозологий механизмов развития больших эозинофилий крови относятся подавление или дефекты системы апоптотической гибели эозинофилов [Druilhe A. et al., 1996; Воробьев А.И., 2002].

В последние годы расшифрованы молекулярные механизмы реализации запрограммированной гибели клетки, опосредованные системами внутриклеточной и межклеточной сигнализации [Невзорова В.А. и соавт., 2001; Мойбенко А.А. и соавт., 2005; Тяжелова В.Г., 2005; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006; Орловская И.А. и соавт., 2006]. При этом цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияние которых на апоптоз интенсивно изучается. Так, ряд цитокинов (IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1, IL-10) являются индукторами апоптоза как здоровых, так и злокачественно-трансформированных клеток [Meagher L.C. et al., 1996; Потапнев М.П., 2002; Бережная Н.М., 2005]. Вместе с тем

выявлена большая группа медиаторов (IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IFN- $\alpha$ ), действие которых способствует запуску эндогенной программы защиты клеток от апоптотической гибели [Невзорова В.А. и соавт., 2001; Потапнев М.П., 2002]. При этом эффект некоторых цитокинов может быть разнонаправленным и зависеть как от типа клеток, так и от особенностей их функционального состояния [Потапнев М.П., 2002].

По данным ряда авторов, иммунорегуляторные молекулы, секретируемые преимущественно Th2-лимфоцитами, такие как IL-5, IL-3, а также гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), активируют эозинофильные гранулоциты и увеличивают их выживаемость *in vitro*, задерживая индукцию апоптоза [Tai P.C. et al., 1991; Yamaguchi Y. et al., 1991; Simon H. et al., 1997; Simon H., Alam R., 1999]. Кроме того, в литературе существуют сведения, согласно которым повышенный уровень eotaxin – хемокина CC-семейства, обладающего хемоаттракционным эффектом в отношении эозинофильных лейкоцитов, может вносить существенный вклад в формирование гемической и тканевой эозинофилии при патологических процессах разного генеза [Rothenberg M.E., 1999].

В этой связи представляет особый интерес выявление общих закономерностей и особенностей цитокинопосредованной дисрегуляции апоптоза эозинофилов при заболеваниях, сопровождающихся большими эозинофилиями крови. Выявление ключевых звеньев патогенеза этого синдрома позволит разработать патогенетически обоснованные подходы управления реактивностью эффекторных клеток крови – эозинофилов.

**Цель исследования:** установить роль нарушения цитокинопосредованной регуляции апоптоза эозинофильных лейкоцитов в механизмах развития больших эозинофилиях крови.

**Задачи исследования:**

1. Выявить роль нарушений апоптотической гибели эозинофильных лейкоцитов при формировании гиперэозинофилии крови, осложняющей

течение лимфопролиферативных гематологических заболеваний и описторхоза.

2. Оценить уровень продукции ключевых регуляторов программированной гибели эозинофилов - ИЛ-3, ИЛ-5 мононуклеарными клетками и концентрации eotaxin в сыворотке крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови (лимфогранулематоз, множественная миелома, неходжкинские лимфомы) и описторхозом (острая и хроническая формы), ассоциированных с гиперэозинофилией.

3. Установить общие закономерности и особенности реализации ИЛ-3-, ИЛ-5-, eotaxin-опосредованного апоптоза эозинофилов у пациентов с большими эозинофилиями крови.

**Научная новизна.** Впервые с привлечением широкого комплекса современных гематологических, культуральных и молекулярно-биологических методов исследования представлены данные фундаментального характера о механизмах нарушения цитокиноопосредованной гибели эозинофильных клеток в патогенезе больших эозинофилий крови при лимфопролиферативных гематологических заболеваниях и описторхозе. Продемонстрирован факт угнетения апоптоза эозинофилов при развитии гиперэозинофилии у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови и больных описторхозом. Представлены приоритетные данные, касающиеся ключевой роли эозинофилтропных цитокинов (ИЛ-3, ИЛ-5 и eotaxin) в реализации гиперэозинофильной реакции крови при лимфопролиферативных заболеваниях и описторхозе. Впервые получены результаты экспериментальных исследований *in vitro*, свидетельствующие о различной чувствительности эозинофильных гранулоцитов при больших эозинофилиях крови, осложняющих течение лимфопролиферативных гематологических заболеваний и описторхоза, к действию цитокинов с антиапоптотической активностью.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные фундаментального характера о нарушении цитокиноопосредованного

апоптоза эозинофилов у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом раскрывают новые молекулярно-клеточные аспекты патогенеза больших эозинофилий крови. Результаты настоящего исследования могут быть положены в основу разработки новой патогенетически обоснованной тактики коррекции гиперэозинофилии при гемобластозах и описторхозе.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Большие эозинофилии крови при лимфопролиферативных заболеваниях и описторхозе сопряжены с ингибированием апоптотической гибели эозинофилов.

2. Механизмы формирования гиперэозинофилии ассоциированы с увеличением продукции IL-3, IL-5 и eotaxin - цитокинов, обладающих антиапоптотическими свойствами.

3. Выраженность программированной гибели эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, при дополнительной стимуляции *in vitro* рекомбинантными формами цитокинов (IL-3, IL-5 и eotaxin) различна, что свидетельствует о различной чувствительности эозинофильных гранулоцитов к действию цитокинов, блокирующих апоптоз клеток.

**Апробация и реализация работы.** Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на VIII Конгрессе «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении» (Москва, 2006), Российском медицинском форуме-2006 «Фундаментальная наука и практика» (Москва, 2006).

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом по грантам Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ, «Молекулярные основы нарушения гомеостаза клеток крови при актуальных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (НШ-4153.2006.7), а также результаты научно-исследовательских работ «Роль нарушений межклеточной кооперации в механизмах формирования больших



эозинофилий крови» 2005-РИ-19.0/002/010 (государственный контракт № 02.442.11.7056 от 26.10.2005), «Молекулярные и клеточные основы управления реактивностью системы крови при актуальных заболеваниях инфекционной природы» 2006-РИ-112.0/001/384 (государственный контракт № 02.445.11.7419 от 09.06.2006 г.), выполненных в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники РФ на 2002-2006 годы».

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 работ, из которых 6 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 10 рисунками и 19 таблицами. Библиографический указатель включает 272 источника (86 - отечественных и 186 - иностранных).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

### РОЛЬ НАРУШЕНИЯ АПОПТОЗА ЭОЗИНОФИЛОВ В МЕХАНИЗМАХ РАЗВИТИЯ БОЛЬШИХ ЭОЗИНОФИЛИЙ КРОВИ

#### 1.1. Причины развития «больших эозинофилий крови». Общие представления о структуре, свойствах и функциях эозинофильных лейкоцитов

Одним из часто встречаемых в клинике внутренних болезней гематологических синдромов является эозинофилия. По данным Л.Д. Гриншпун [1983], эозинофилия – это состояние, при котором уровень эозинофилов в крови достигает 5% и выше. Те состояния, при которых содержание эозинофилов в крови увеличивается более 15%, И.А. Кассирским и А.И. Воробьевым были названы «большими эозинофилиями крови» [Гриншпун Л.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Чучалин А.Г., 2003; Егоров И.В., Котина Л.Н., 2004; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Абдулкадыров К.М., 2006].

В литературе описаны эозинофилии аллергического, инфекционного, аутоиммунного, опухолевого генеза, а также идиопатические и ятрогенные, в том числе лекарственные [Анаев Э.Х., 2002; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Чучалин А.Г., 2003]. Наиболее частыми причинами эозинофилий аллергического генеза являются бронхиальная астма, атопический дерматит, поллиноз, крапивница, ангионевротический отек Квинке и др. [Фассахов Р. С. и соавт., 1992; Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999]. Эозинофилии сопровождают паразитарные инвазии: описторхоз, токсокароз, эхинококкоз, аскаридоз, трихинеллез, анкилостомоз, шистосомоз [Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998]. Этот феномен часто бывает первым признаком миграционной фазы развития гельминтов, свидетельствующим о наличии заболевания. Кроме того, эозинофилия встречается при таких инфекционных заболеваниях, как скарлатина, инфекционный мононуклеоз, стафилококковая инфекция и др. [Коровина Н.А. и соавт., 2002; Чучалин А.Г., 2003; Абдулкадыров К.М., 2006].

Синдром эозинофилии зачастую выявляется у больных с заболеваниями сердца и сосудов, что вызывает трудности дифференциальной диагностики достаточно сложной группы заболеваний эндомиокарда и сосудов (системные васкулиты) [Чучалин А.Г., 2003]. Более редкими на сегодняшний день считаются эозинофилии аутоиммунного генеза (эозинофильный фасциит и миозит, эозинофильный гастроэнтерит, эозинофильный цистит, эндокардит Леффлера и др.) [Коровина Н.А. и соавт., 2002].

Эозинофилии, патогенез которых сопряжен с опухолевой пролиферацией эозинофилов, относятся к злокачественным. Так, эозинофильный миелобластоз характеризуется бурным течением, лихорадкой, гепатоспленомегалией, лимфоаденопатией, геморрагическим синдромом; в крови выявляются эозинофильные миелобласты, промиелоциты и миелоциты. Также эозинофилия может сопровождать ряд онкологических заболеваний: острые и хронические лейкозы, рак кожи, легких, носоглотки, аденокарцинома желудка, болезнь Ходжкина, лимфома и др. [Коровина Н.А. и соавт., 2002]. Кроме того, в гематологической практике встречается группа эозинофилий «неясного генеза» - идиопатические эозинофилии, которые характеризуются повышением количества эозинофилов в крови свыше  $1500 \text{ в } 1 \text{ мм}^3$ ; продолжительностью более 6 месяцев, отсутствием известных причин, вызывающих эозинофилию (аллергические заболевания, паразитарные инвазии и др.), а также доминированием симптомов полиорганного поражения [Хорошко Н.Д. и соавт., 1997; Чучалин А.Г., 2003; Егоров И.В., Котина Л.Н., 2004; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Абдулкадыров К.М., 2006].

Выраженное увеличение количества эозинофилов в крови может возникнуть при приеме некоторых лекарственных препаратов: наиболее часто гиперэозинофилию вызывают антибиотики, цитостатики, нестероидные противовоспалительные, а также психотропные препараты. При этом эозинофилия протекает бессимптомно и становится единственным проявлением гиперчувствительности к препарату [Анаев Э. Х., 2002].

Заболевания, ассоциированные с эозинофилией крови  
 [по данным Г.Д. Гриншпун, Ю.Е. Виноградовой, 1983; Э.Х. Анаева, 2002; А.Г. Чучалина, 2003; Н.М. Бережной и соавт., 2005; К.М.Абдулкадырова, 2006].

№ п/п	Причины формирования эозинофилий
1.	Аллергические заболевания (бронхиальная астма, атопический дерматит, аллергический ринит, крапивница, ангионевротический отек Квинке, поллиноз и др.).
2.	Инфекционные заболевания (инфекционный мононуклеоз, инфекционный лимфоцитоз, туберкулез, сифилис, скарлатина), в том числе паразитарные инвазии (описторхоз, трихинеллез, шистосомоз, эхинококкоз, аскаридоз и др.).
4.	Коллагенозы, системные васкулиты (ревматоидный артрит, системная красная волчанка, узелковый периартериит, саркоидоз, эозинофильный фасциит и миозит и др.).
5.	Легочная эозинофилия (простая эозинофильная пневмония (синдром Леффлера), острая и хроническая эозинофильная пневмония, тропическая легочная эозинофилия).
6.	Злокачественные новообразования (рак желудка, гипернефроидный рак почки, рак легких, поджелудочной железы, толстого кишечника, шейки матки, яичников, лимфо- и миелопролиферативные заболевания системы крови).
7.	Заболевания кожи и подкожной клетчатки (экссфолиативный дерматит, экзема, псориаз, пузырьчатка и др.).
8.	Иммунные нарушения (реакция «трансплантат против хозяина», синдром врожденного иммунодефицита).
9.	Применение лекарственных препаратов (антибиотики, сульфаниламидные, противотуберкулезные, нестероидные противовоспалительные препараты, антидепрессанты и др.).
10.	Идиопатический гиперэозинофильный синдром
11.	Прочие заболевания (гипофизарная кахексия, гипофункция надпочечников, цирроз печени, семейная эозинофилия).

Как видно, спектр заболеваний, сопровождающихся развитием эозинофилий, весьма значителен (табл. 1). Важно отметить, что длительная гиперэозинофилия крови сопряжена с формированием тяжелых осложнений, обусловленных тем, что эозинофильный гранулоцит обладает высоким цитотоксическим потенциалом, реализуемым не только в отношении инородных субстанций, но и собственных тканей организма. К числу

состояний, вызванных гиперэозинофилией, относятся васкулиты, эндо- и миокардит, фиброзирующий альвеолит, гепатит, поражение нервной системы, эрозивный гастродуоденит, тромбоэмболические осложнения [Абрамычев А.Н. и соавт., 1984; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Мокеева Р.А., 2000; Озерецковская Н.Н., 2000; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Куропатенко М.В., Желенина Л.А., 2005]. Говоря о возможных негативных последствиях больших эозинофилий крови, прежде всего необходимо остановиться на рассмотрении структурно-функциональных особенностей эозинофилов.

Известно, что эозинофилы, как и другие полиморфноядерные лейкоциты, происходят из единой стволовой клетки костного мозга при регулирующей роли интерлейкина (IL)-2, IL-3, IL-5 и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF). Было установлено, что основным фактором, вызывающим дифференцировку эозинофильных гранулоцитов, является IL-5, продуцируемый Th-2 лимфоцитами и самими эозинофилами [Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Беклемишев Н.Д., 1998; Palframan R.T. et al., 1998; Zangrilli J.G., 2002].

По данным литературы, продолжительность жизни эозинофилов составляет 10-12 дней. Покинув костный мозг, где они образуются и созревают в течение 3-4 дней, эозинофилы несколько часов циркулируют в крови (период их полужизни составляет 3-8 часов). В дальнейшем клетки покидают кровяное русло и мигрируют в ткани (кожа, слизистые оболочки дыхательного и желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей), являясь прежде всего, по данным ряда исследователей, тканевыми клетками: на один циркулирующий эозинофил приходится примерно 300 аналогичных клеток в костном мозге и от 100 до 300 - в других тканях [McEwen V.J., 1992; Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Абдулкадыров К.М., 2006].

Очевидно, что количество эозинофилов в крови зависит от интенсивности и скорости костно-мозгового эозинофилопоэза, скорости поступления зрелых эозинофилов из костного мозга в периферическую кровь, степени

выраженности миграции эозинофильных гранулоцитов в ткани, длительности жизни и интенсивности разрушения эозинофилов крови. В настоящее время известно, что количество циркулирующих эозинофилов регулируется эндокринной и вегетативной нервной системами, которые обеспечивают колебания их суточного ритма. Так, симпатический отдел вегетативной нервной системы, гормоны щитовидной железы, инсулин, адренокортикотропный гормон, глюкокортикоиды снижают численность эозинофилов в крови. В свою очередь действие парасимпатического отдела вегетативной нервной системы повышает число эозинофилов [Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999; Воробьев А.И., 2002; Коровина Н.А. и соавт., 2002].

Морфологически эозинофилы представляют собой зернистые лейкоциты, содержащие в протоплазме крупные гранулы, окрашивающиеся кислыми красками (эозином) в оранжево-розовый цвет. В нефиксированных неокрашенных препаратах эозинофилы выглядят округлыми клетками диаметром до 9 нм, в протоплазме которых визуализируются крупные гранулы; в фиксированных окрашенных мазках их диаметр приближается к 12 нм. Ядро эозинофильных лейкоцитов расположено эксцентрично, имеет кристаллоидную структуру и состоит из малого количества сегментов (иногда их число достигает 3-5). Вокруг ядра обнаруживается слегка базофильная цитоплазма, особенностью которой является наличие двух типов специфических гранул (больших и малых), имеющих красный или оранжевый цвет. Встречаются и неокрашенные L-гранулы, содержащие белки, фосфолипиды, гистамин, ферменты (оксидаза, пероксидаза, антигиалуронидаза) и микроэлементы [Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Коровина Н.А. и соавт., 2002].

Современная наука рассматривает эозинофил как одну из ключевых клеток воспаления в связи с наличием кислороднезависимого, обусловленного действием белков больших и малых гранул, и кислородзависимого механизмов микробицидности. Последний опосредован активацией НАДФН-оксидазы и продукцией активных метаболитов кислорода. Следует

подчеркнуть, что данные продукты не имеют специфичности в отношении чужеродных агентов и обладают способностью повреждать собственные клетки организма, особенно эпителий кишечника, легких и кожу. Активность НАДФН-оксидазы в эозинофилах существенно выше, чем в других фагоцитах. Это, по-видимому, обуславливает вклад эозинофильных гранулоцитов в механизмы повреждения собственных тканей организма при таких заболеваниях, как атопический дерматит, болезнь Крона, бронхиальная астма и ряд других [Фассахов Р.С. и соавт., 1992; Yagisawa M. et al., 1996]

Известно, что большие гранулы содержат протеины, которые являются уникальными для эозинофилов (рис. 1). К ним относятся: большой основной протеин, эозинофильный катионный протеин, эозинофильная пероксидаза, эозинофильный нейротоксин, ранее называемый эозинофильным протеином X. Было показано, что в активированных эозинофилах число гранул значительно уменьшается и клетки часто вакуолизируются, становясь менее плотными, чем неактивированные эозинофилы [Hamann K.J. et al., 1991; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Анаев Э.Х., 2002].

Среди компонентов гранул эозинофилов следует выделить большой основной протеин, составляющий до 55% от содержания белковых молекул и занимающий сердцевину кристаллоидов больших гранул. Большой основной протеин обладает сродством к анилиновым красителям, а также свойством полимеризации и агрегации, что обуславливает его цитотоксичность к различным типам животных клеток. Установлено, что этот белок обладает способностью нейтрализовать гепарин, повреждать личинки ряда паразитов, а также некоторые клетки организма [Ackerman S.J., 1983; Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004]. Другим важным компонентом больших гранул является эозинофильный катионный протеин, содержащий большое количество аргинина и цинка. Эозинофильный катионный белок известен своими токсическими свойствами в отношении паразитарных агентов (в 8-10 раз более активен, чем большой основной белок). Установлено, что он принимает активное участие в

воспалительных реакциях, способен оказывать влияние на плазменный гемостаз через XII фактор свертывания и обладает повреждающим действием на эндотелий сосудов [Namann K.J. et al., 1991; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Не менее важным компонентом больших гранул является эозинофильная пероксидаза, представляющая собой высокоосновной белок ( $pH > 11$ ), встречающийся в виде мономеров с молекулярной массой 75 кДа и димеров с массой 150 кДа. Известно, что в присутствии  $H_2O_2$  и галогенов пероксидаза эозинофилов формирует с ними потенциальную цитотоксическую систему, эффективную против вирусов, бактерий, паразитов, грибов, опухолевых клеток, действие которой, вероятно, опосредовано через образование гипогалогеновой кислоты [Thomas E.L. et al., 1995]. Следует отметить, что эозинофильная пероксидаза может индуцировать дегрануляцию тучных клеток, инактивировать лейкотриены [Henderson W.R. et al., 1982]. Пероксидаза способна привлекать макрофаги для более эффективного уничтожения микроорганизмов и связываться с поверхностью неопластических клеток, делая их восприимчивыми к опосредованному макрофагами цитолизу [Фассахов Р.С. и соавт., 1992; Анаев Э.Х. и соавт., 1994]. Содержащийся в эозинофилах нейротоксин способен вызывать неврологические нарушения с поражением мозжечка, моста и спинного мозга при инъекции в ликвор или головной мозг кроликов или морских свинок [Ackerman S.J., 1983; Анаев Э.Х., 1994]. Его токсическое действие в отношении макроорганизма в наибольшей степени проявляется при гиперэозинофилиях [Воробьев А.И., 2002].

Как уже упоминалось ранее, в эозинофилах присутствуют малые гранулы, содержащие кислую фосфатазу и арилсульфатазу В, инактивирующие субстанции анафилаксии и уменьшающие выраженность реакции немедленной гиперчувствительности; фосфолипазу D, нейтрализующую литический фактор активации тромбоцитов и снижающую способность тромбоцитов к дегрануляции; лизофосфолипазу, определяющуюся в тканях и жидкостях в местах воспаления, в том числе в больших количествах в



кристаллах Шарко-Лейдена; коллагеназу, разрушающе воздействующую на I и III типы коллагена, которых особенно много в легочной ткани [Фассахов Р.С. и соавт., 1992; Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

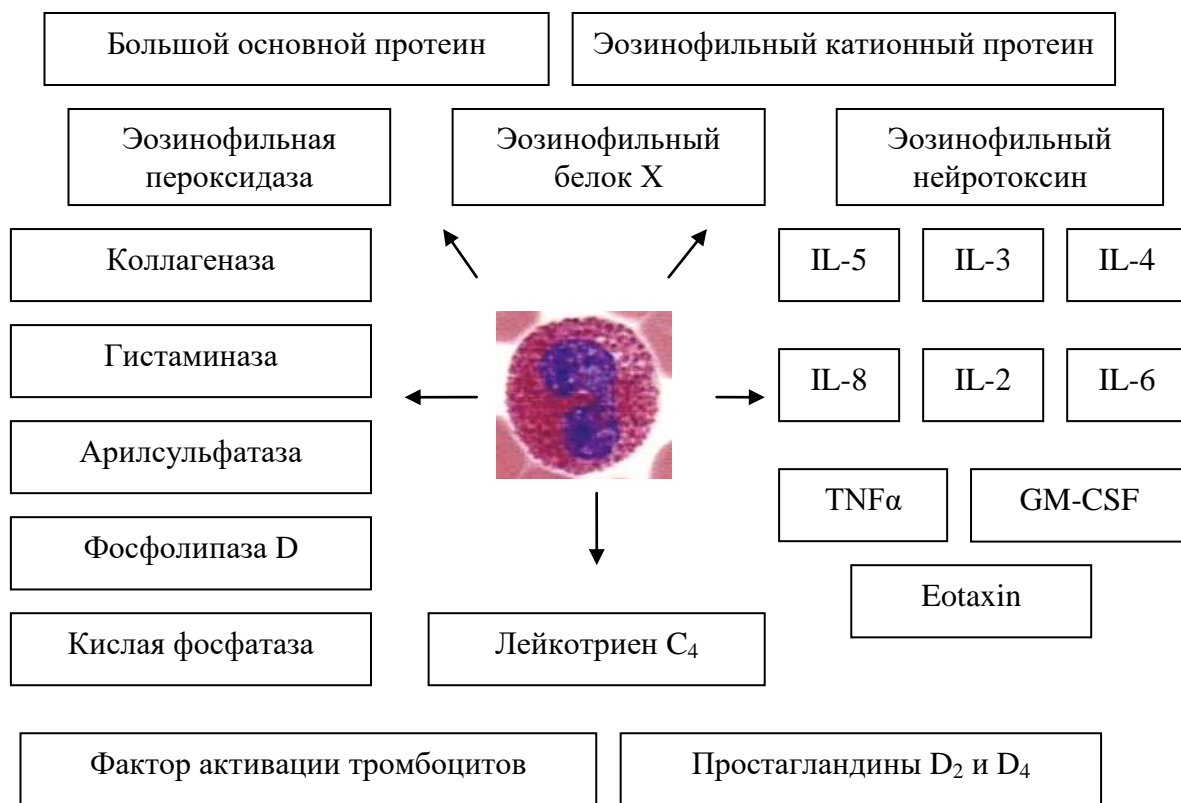


Рис 1. Медиаторы эозинофильных гранулоцитов [по данным М.А. Giembycz, М.А. Lindsay; 1999, А.И. Воробьева, 2002; Н.М. Бережной, 2005].

Было показано, что ряд медиаторов синтезируются эозинофилами из мембранных фосфолипидов при активации клетки. Наиболее значимыми из них являются лейкотриен (LT) C<sub>4</sub> и фактор активации тромбоцитов (PAF). Известно, что LTC<sub>4</sub> и PAF являются сильнейшими бронхоконстрикторами, а последний, помимо этого, обладает выраженной хемотаксической активностью по отношению к эозинофильным лейкоцитам [Agrawal D.K. et al., 1992; Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Беклемишев Н.Д., 1998; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004].

Как уже было сказано выше, цитотоксическая активность компонентов эозинофильных гранул может быть реализована не только в отношении различных чужеродных агентов, но и собственных структур организма.

Установлено, что эозинофильные белки обладают некоторой избирательностью воздействия на те или иные клетки и ткани. Так, большой основной протеин реализует цитолитическую активность в отношении эпителия трахей, почек, слизистых желудочно-кишечного тракта, нейротоксин и эозинофильный катионный протеин поражают структуры нервной системы, а эозинофильная пероксидаза – бронхолегочной системы [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999].

Установлено, что мембрана эозинофилов несет различные антигенные структуры: CD13, CD33, свойственные гранулоцитарному росту; молекулы, определяющие способность к адгезии и взаимодействие с другими клетками, в частности CD11b, CD44, CD69; различные интегрины; рецепторы для активированных компонентов комплемента (C3b, C3d, C4); ряд молекул, обеспечивающих активацию эозинофильных гранулоцитов (CD28L, CD69); рецепторы для гистамина (H<sub>1</sub> и H<sub>2</sub>), простагландинов, хемокинов семейства CC [Гриншпун Л.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Ember J.A., Nugli T.E., 1997; Воробьев А.И., 2002]. С помощью проточной цитофлуорометрии на эозинофилах определена экспрессия рецепторов для IL-3, IL-5 и GM-CSF, обнаружена молекула CD95 (FasR) [Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999].

Особое внимание среди вышеперечисленных структур привлекает CD69 - маркер активации, определяемый не только на эозинофилах, но и на гранулоцитах, а также лимфоцитах. Количество CD69 на эозинофилах увеличивается при аллергической патологии, бактериальном воспалении и др. [Nishikawa K. et al., 1992]. Экспрессия CD11b/CD18 ( $\alpha$ - и  $\beta$ -цепей интегрин Mac-1) и CD66b, согласно имеющимся данным, увеличивается при воспалительных процессах. Установлено, что экспрессия на эозинофилах костимуляторной молекулы CD28-лиганд (CD28L) необходима в качестве второго контрольного сигнала для оптимальной активации эозинофила при взаимодействии с CD4<sup>+</sup>-лимфоцитами. Благодаря этому сигналу увеличивается секреция эозинофилами медиаторов IL-2 и IFN $\gamma$  [Воробьев А.И., 2002].

Неизменный интерес вызывают рецепторы для иммуноглобулинов и иммунных комплексов, а точнее - рецепторы к Fc-фрагменту IgG и IgE. Следует отметить, что эозинофильные лейкоциты презентруют не только низкоаффинный FcεRII, но и высокоаффинный FcεRI [Abdelilah S.G. et al., 1998]. В дальнейшем выяснилось, что число FcεRI на мембране эозинофилов незначительно (он в основном представлен внутриклеточно). При активации этого рецептора резко увеличивается цитотоксичность эозинофилов, их дегрануляция, повышается продукция супероксидных анионов и секреция IL-10 [Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Оказалось, что на эозинофилах имеется высокий уровень низкоаффинного IgG-рецептора (FcγRII, CD32). FcγRI появляется после сенсбилизации на очень малом количестве эозинофилов (на 0,5 %) [Фассахов Р.С. и соавт., 1992; Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Если говорить о рецепторах для ряда компонентов комплемента (C3, C4 и C5), очевидно, их концентрация увеличивается в период участия эозинофилов в иммунных реакциях, поскольку C3a представляет собой специфический хемоаттрактант эозинофилов, активирующий НАДФН и способствующий выбросу эозинофильного катионного протеина, пероксидазы и нейротоксина. C5a, в свою очередь, также является хемоаттрактантом, потенцирует образование радикалов кислорода, некоторых цитокинов и производных арахидоновой кислоты, стимулирует дегрануляцию, модулирует экспрессию ряда рецепторов и адгезивных молекул [Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Эозинофилы экспрессируют рецепторы для ряда цитокинов, в том числе IL-3, IL-5 и GM-CSF [Zangrilli J.G., 2002; Barnes P.J., 2003]. Роль этих медиаторов как ключевых регуляторов гомеостаза эозинофильных клеток будет рассмотрена ниже. Наряду с этим на поверхности этих лейкоцитов презентуются рецепторы хемокинов семейства CC, к которому относят eotaxin, eotaxin-2, RANTES, MCP-2, MCP-3 и MCP-4. Вышеперечисленные медиаторы обладают способностью активировать НАДФН-оксидазу в

эозинофильных гранулоцитах, опосредуют усиление адгезии к фибронектину и VCAM1 (vascular cell adhesion molecule), повышают экспрессию CD11b, стимулируют высвобождение IL-8 из эозинофилов [Heath H. et al., 1997; Gienbycz M.A., Lindsay M.A., 1999]. Известно также, что презентация рецепторов к eotaxin обычно ассоциируется с развитием воспалительного процесса; у здоровых людей существует некий базальный уровень экспрессии цитокина, который опосредует распределение эозинофилов в ткани. В аллергических реакциях перечисленные хемокины в синергизме с IL-5 способствуют мобилизации эозинофилов в патологический очаг [Humbles A.A. et al., 1997]. Eotaxin и eotaxin-2 *in vivo* избирательно инициируют кожные эозинофилии у человека [Forssmann U., 1997]. Местную эозинофилию провоцирует RANTES, вводимый под кожу [Meurer R., 1993]. Помимо этого, он обуславливает дегрануляцию эозинофилов с высвобождением эозинофильного катионного протеина и нейротоксина [Karr A. et al., 1994].

Простагландин D<sub>2</sub>, связываясь со специфическим DP-рецептором на поверхности эозинофилов, потенцирует их хемотаксис [Boie Y. et al., 1995]. В эксперименте *in vivo* PgD<sub>2</sub> вызывал эозинопению и избирательное накопление эозинофилов в дыхательных путях [Emery D.L., 1989].

Учитывая кинетику эозинофилов, нельзя не упомянуть об их миграции в патологический очаг. В процессе воспаления и реализации аллергических реакций эозинофилы проникают из кровеносного русла в ткани. Следует подчеркнуть, что процесс миграции клеток осуществляется под влиянием факторов хемотаксиса эозинофилов, освобождаемых при аллергических реакциях другими клетками, а также самими эозинофилами, уже мигрировавшими в ткань. В литературе имеются сведения, что наиболее значимыми являются PAF, LTD, C5a, IL-2 и RANTES. Наряду с этим есть данные о существовании специфических эозинофильных хемоаттрактантов – eotaxin и eotaxin-2. Интересно, что их эффект слабее, чем у вышеназванных факторов. Существует гипотеза, что для направленной миграции эозинофилов в ткани требуются как специфический хемоаттрактант (eotaxin), так и цитокин,

повышающий активность эозинофилопоэза (IL-5) [Forssmann et al., 1997; Rollins B.J., 1997; Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999; Rothenberg M.E., 1999; Zangrilli J.G., 2002].

Говоря о роли эозинофилов, нужно отметить, что их функция сводится к предупреждению проникновения антигена в сосудистое русло, то есть генерализации иммунного ответа. В частности, область локальной иммунной реакции, развивающейся при проникновении антигена, эозинофильные гранулоциты отграничивают с помощью нейтрализации метаболитов, участвующих в уничтожении антигена. При образовании большого количества метаболитов место реакции локализуется с помощью местного некроза и активации фиброзирования вокруг этого участка. Известно, что в формировании этого процесса своеобразная роль принадлежит эозинофилам, которые завершают иммунный ответ на уровне подслизистого и подэпителиального слоя, защищая, таким образом, организм от множества нецелесообразных общих иммунных реакций на небольшие дозы проникающих чужеродных антигенов [Воробьев А.И., 2002].

Следует отметить значительную роль эозинофилов в развитии реакций гиперчувствительности немедленного типа. Так, под влиянием хемотаксических факторов, выделяемых сенсibilизированными Т-лимфоцитами, эозинофилы мигрируют к месту иммунной реакции на самых первых ее этапах. В период миграции и инфильтрации происходит усиленное созревание эозинофилов, увеличение активности ферментов и рецепторов для иммуноглобулинсодержащих комплексов и активированных факторов комплемента. Реализация реакции немедленной гиперчувствительности заключается во взаимодействии IgE-антител с аллергеном на поверхности тучных клеток и приводит к выбросу субстанций анафилаксии и гистамина. Известно, что ответ эозинофилов состоит в выделении инактивирующих субстанций: гистаминазы инактивируют гистамин, арилсульфатаза - медленно действующие субстанции анафилаксии, хемотаксические пептиды. Кроме того, фосфолипаза В и D инактивирует литический фактор

тромбоцитов и препятствует выходу серотонина из тромбоцитов, большой основной белок эозинофилов инактивирует гепарин, P<sub>gE1</sub> и P<sub>gE2</sub> [Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Помимо этого, эозинофилы могут фагоцитировать гранулы, выделяемые тучными клетками, препятствуя освобождению из них гистамина и протеаз. Благодаря наличию вышеперечисленных факторов, эозинофилам принадлежит модулирующая роль в развитии аллергических реакций. Интересен тот факт, что после всестороннего подавления реакции гиперчувствительности немедленного типа эозинофилы способствуют восстановлению тканевых тучных клеток, выполняя при этом репарационную функцию [Гриншпун Л.Д., Виноградова Ю.Е., 1983].

Приведенный перечень как рецепторных структур, так и продуктов, которые выделяют эозинофилы, позволяет сделать заключение о том, что эти клетки являются активными участниками многих физиологических и патологических процессов - фагоцитоза, репарации, воспаления, реализации врожденного и приобретенного иммунитета, а также принимают участие в регуляции функций клеток системы иммунитета, процессов свертывания крови. Учитывая современные представления, эозинофил следует рассматривать не только в качестве активного участника патогенеза аллергических заболеваний и противогельминтного иммунитета, но и как важный фактор поддержания иммунологического и тканевого гомеостаза.

В свою очередь нарушения эозинофильного гомеостаза чреваты дисбалансом процессов, в которых эти клетки играют доминирующую роль.

## **1.2. Роль дизрегуляции апоптоза эозинофильных гранулоцитов в патогенезе эозинофилии**

Все известные на сегодняшний день механизмы эозинофилии (антителозависимый хемотаксис, развивающийся при участии IgE- или IgG-антител при паразитозах; иммунный при аллергии, опосредованный через IgE; ответ на эозинофильный хемотаксический фактор, выделяемый некоторыми опухолями; собственно опухолевая эозинофилия) не позволяют всесторонне

охватить патогенез этого феномена при различных патологических процессах [Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998].

Существует мнение, что одним из ключевых механизмов развития эозинофилии может быть подавление или дефекты апоптоза ацидофильных гранулоцитов [Druilhe A. et al., 1996; Воробьев А.И., 2002]. Ингибирование апоптотической гибели эозинофилов приводит к развитию эозинофилии крови и тканей и вносит существенный вклад в патогенез различных заболеваний. Наиболее изучен феномен нарушения программированной гибели эозинофилов при бронхиальной астме, часто осложняющейся развитием гиперэозинофильного синдрома. В частности, у больных бронхиальной астмой в биоптатах бронхов уровень апоптотически измененных эозинофильных лейкоцитов ниже, чем у здоровых лиц, и прогрессивно снижается с нарастанием тяжести заболевания. Кроме того, установлено, что в эозинофилах у этих больных существенно повышена экспрессия мРНК антиапоптотических белков семейства Bcl-2, что коррелирует с тяжестью заболевания [Vignola A.M. et al., 1999; Деев И.А., 2004]. Наряду с этим у пациентов с бронхиальной астмой угнетение апоптоза эозинофильных клеток сочетается с отсутствием активации FasR и FasL, осуществляющих запуск реализации программированной гибели эозинофилов у здоровых лиц [Druilhe A. et al., 1996]. Этот факт объясняется обнаруженным у данной категории больных значительным увеличением содержания растворимого Fas-рецептора в сыворотке крови [Kato M. et al., 1999]. Помимо этого, у пациентов с бронхиальной астмой в эозинофилах крови снижена экспрессия гена p53, регулирующего запуск процесса апоптотической гибели [Деев И.А., 2004].

В исследованиях *in vitro* установлено, что ряд цитокинов обладает способностью увеличивать продолжительность жизни эозинофильных гранулоцитов, регулируя процесс их программированной гибели. К ним относятся IL-5, IL-3 и GM-CSF [Tai P.C. et al., 1991; Yamaguchi Y. et al., 1991]. Согласно данным литературы, у больных бронхиальной астмой

содержание перечисленных медиаторов в крови увеличено и, по-видимому, вносит вклад в развитие эозинофилии [Corrigan C.J. et al., 1993; Мамонтова Т.В., Кайдашев И.П., 2005; Райкис Б.Н., Гогуюева М.Н., 2006]. Также установлено, что после провокации аллергеном экспрессия мРНК IL-5 повышается в эозинофилах, выделяемых из бронхо-альвеолярной жидкости больных бронхиальной астмой [Broide D.H. et al., 1992] и в коже больных atopическим дерматитом [Tanaka Y. et al., 1994]. Изучая реализацию апоптоза эозинофильных лейкоцитов, полученных у пациентов с бронхиальной астмой, И.И. Иванчук и соавт. [2003] пришли к выводу, что IL-5 стимулирует экспрессию мРНК bcl-2, обладающего способностью ингибировать программированную гибель клетки. Следует также отметить, что исследование гранулоцитов эозинофильного ряда в мокроте больных бронхиальной астмой выявило положительные корреляции между активностью bcl-2 и уровнем мРНК IL-5 [Деев И.А. и соавт., 2004] и отрицательные между интенсивностью экспрессии bcl-2 и объемом форсированного выдоха в течении первой секунды [Jang A.S. et al., 2000]. Не менее важно отметить, что добавление IL-5 в культуру лейкоцитов эозинофильного ряда, полученных у пациентов с бронхиальной астмой, не вызывало изменений в активности апоптотической гибели, что по-видимому связано с развитием функциональной резистентности клеток к действию этого медиатора [Иванчук И.И. и соавт., 2004].

Как видно из представленных выше фактических данных, в настоящее время доказан факт нарушения цитокинопосредованного апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме. Однако перед рассмотрением этого механизма развития эозинофилий при других нозологиях (лимфопролиферативные заболевания системы крови, описторхоз) целесообразно, на наш взгляд, сконцентрироваться на детализации существующих представлений о молекулярных механизмах реализации апоптотической гибели клетки.



### 1.2.1. Молекулярные основы реализации апоптотической гибели клеток

В настоящее время известно, что процессы роста, развития и жизнедеятельности макроорганизма неразрывно связаны с постоянным обновлением клеточного состава. Апоптоз представляет собой универсальную многокомпонентную систему, выполняющую чрезвычайно важную функцию – регуляцию численности клеточной популяции [Белушкина Н.Н. и соавт., 1998; Самуилов В.Д., 2000].

Нарушение реализации апоптотической гибели клеток (ее усиление или ослабление) является основой ряда заболеваний, затрагивающих различные системы. Так, ингибирование программированной клеточной гибели признается в качестве важного патогенетического звена развития аутоиммунных заболеваний, онкопатологии и др. Усиление апоптоза лежит в основе инфекционных и нейродегенеративных заболеваний, патогенеза поражения ионизирующей радиации, механизма действия химиотерапевтических средств и др. [Ярилин А.А., 1998].

Детальное изучение различных этапов регуляции процесса программированной клеточной гибели создает перспективу разработки молекулярных и клеточных технологий, позволяющих воздействовать на отдельные этапы апоптотической гибели клеток с целью ее коррекции [Белушкина Н.Н. и соавт., 1998].

Общеизвестно, что в развитии апоптотической гибели клеток выделяют три стадии: индукторную, эффекторную и деградации. Эффекторная стадия и стадия деградации универсальны для всех видов апоптоза, в то время как первая стадия определяется разнообразием индукторных факторов. При этом процесс индукции апоптоза можно разделить на два вида: первый – ситуации, когда программа гибели клетки включается внешними факторами; вторая категория – случаи, когда запуску апоптоза предшествует каскад внутриклеточных событий. Так, к внеклеточным сигналам относятся действие антигенов, гормонов и цитокинов. В свою очередь, внутриклеточными сигналами являются нерепарированные повреждения ДНК, а также

дефицит стимулирующих сигналов. Эффекторная стадия включает изменения в клетке, вызванные действием индукторных факторов, такие как активация сериновых протеаз и снижение трансмембранного потенциала митохондрий [Ярилин А.А., 1998].

Следует отметить, что наиболее характерным проявлением апоптотической гибели клетки является деградация хроматина, в основе которой лежит ферментативное расщепление молекул ДНК, осуществляющееся в несколько этапов с формированием мелких фрагментов (от 700 до 30-50 тыс. пар оснований). В дальнейшем происходит межнуклеосомная дезинтеграция молекул ДНК, находящихся между нуклеосомами, с образованием фрагментов, кратных по величине 180-190 пар оснований. Установлено, что деградация хроматина при апоптозе является активным процессом, зависящим от температуры, источников энергии, синтеза РНК и белка *de novo*. Известно также, что различные этапы деградации ДНК катализируются разными формами эндонуклеаз, отличающимися субстратной специфичностью и условиями проявления активности. В частности, среди ферментов, предположительно осуществляющих межнуклеосомную деградацию ДНК, наиболее изучена  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимая эндонуклеаза - резидентный ядерный фермент с молекулярной массой 18 кДа, который в покоящихся клетках неактивен и входит в состав высокомолекулярного комплекса с молекулярной массой 100 кДа; при действии индукторов апоптоза происходит его высвобождение [Уманский С.Р., 1996; Ярилин А.А., 1996, 1998; Маянский А.Н. и соавт., 1997]. В стадию деградации хроматина объем клетки уменьшается, она округляется, теряя микроворсинки, рецепторы и структуры, обеспечивающие межклеточные контакты; в мембране образуются выпячивания, отпочковывающиеся от клетки в виде апоптотических телец, которые поглощаются макрофагами или окружающими клетками [Козинец Г.И., 1996; Маянский Н.А., 2004].

Как уже упоминалось ранее, одним из ключевых факторов, индуцирующих апоптоз, является действие гормонов. Классическим примером такого

влияния служит действие кортикостероидов, проникающих в клетку и проявляющих свое действие через рецепторы, локализующиеся в ядре. Рецептор, связывая лиганд, регулирует транскрипцию гормончувствительных генов, продукты которых опосредуют реализацию этапов клеточного цикла. Кортикостероиды, взаимодействуя с транскрипционными факторами AP-1 (activator protein) и NF- $\kappa$ B (nuclear factor), снижают продукцию ряда веществ с провоспалительной активностью (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, TNF-, GM-CSF и RANTES) [Jantz M.A., Sahn S.A., 1999]. Известно также, что глюкокортикоиды обладают прямым ингибирующим действием на секрецию эозинофилами медиаторов, таких как IL-3, IL-5, GM-CSF, тем самым, ограничивая продолжительность жизни этих клеток [Lamas A.M., 1989].

Другими важными физиологическими регуляторами апоптоза являются цитокины. Цитокины - это обширная группа белков, обеспечивающих пролиферацию и дифференцировку клеток при связывании со специфическими рецепторами на клетках-мишенях. В отличие от гормонов, цитокины действуют, в основном, на пара- и аутокринном уровнях [Белушкина Н.Н. и соавт., 1998] (молекулярные механизмы цитокиноопосредованной регуляции апоптоза будут рассмотрены ниже).

В настоящее время стало известно о существовании специфических рецепторов смерти. Являясь клеточно-поверхностными рецепторами, они передают сигналы апоптоза, инициированные специфическими лигандами, с последующей активацией каскада каспаз. Известно также, что эти рецепторы относятся к суперсемейству рецепторов TNF, так как в своей структуре имеют гомологичные участки – цитоплазматические домены смерти («death domain», DD) [Маянский А.Н. и соавт., 1997]. Наиболее хорошо описаны такие рецепторы, как Fas/APO-1/CD-95 и TNFR1.

Так, по данным литературы, Fas-рецептор является широко распространенным трансмембранным протеином с молекулярной массой 45 кДа, состоящим из 325 аминокислотных остатков [Itoh N., 1991; Watanabe-Fukunaga R., 1992]. Соответственно, в его структуре можно выделить

внеклеточный, трансмембранный и цитоплазматический участки. При этом экстрацеллюлярная часть рецептора состоит из трех, обогащенных цистеином, доменов [Itoh N., 1991]. Примерно 80 аминокислотных остатков образуют домен смерти (DD), который вовлекается в белок-белковое взаимодействие с цитоплазматическими белками, генерируя сигнал смерти. Ген *fas* у человека локализован в длинном плече хромосомы 10 и состоит из 9 экзонов [Watanabe-Fukunaga R. et al., 1992; Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 1996; Уманский С.Р., 1996; Утешев Д.Б. и соавт., 1998].

Известно, что FasL является цитокином и относится к семейству цитокинов TNF. FasL существует в двух формах - нерастворимой или мембрано-связанной и растворимой, отщепляемой от клетки с помощью металлопротеиназы. Подобно другим лигандам рецепторов семейства TNF, гомотример FasL связывается с тремя молекулами FasR [Олейник Е.К. и соавт., 2004].

При связывании лиганда с рецептором происходит агрегация молекул Fas в тримерные кластеры, в которых цитоплазматический DD реагирует с аналогичным доменом цитозольного белка FADD (Fas-associated death domain protein). В свою очередь FADD взаимодействует через DED (death effector domain) с аналогичным доменом белка FLICE (FADD-like ICE), формируя макромолекулярный комплекс белков DISC (death-inducing signaling complex), который обеспечивает передачу сигнала от Fas к каспазам [Boldin M.P., 1995; Nagata S., 1995; Muzio M., 1996, 1998; Владимирская Е.Б., 2002; Фильченков А.А., 2003; Олейник Е.К. и соавт., 2004]. В результате этого процесса происходит активация апоптоз-специфической протеазы каспазы-8 и развиваются характерные для апоптоза процессы [Cohen G.M., 1997; Muzio M., 1997; Бойчук С.В., Мустафин И.Г., 2001]. Так, ряд исследователей показали, что активация Fas-рецептора стимулирует апоптоз эозинофилов путем активации тирозин-киназы, ассоциированной с цитоплазматической частью рецептора [Matsumoto K., 1995; Tsuyuki S., 1995; Druilhe A., 1996; Hebestreit H., 1996; Simon H.U., 1998]. Установлено также,

что кроме активации тирозин-киназ и каспаз для Fas-ассоциированного апоптоза существует другой сигнальный путь, связанный с вовлечением Ras и дальнейшей активацией JNK [Gulbins E., 1995]. H.U. Simon et al. [1998] обнаружили, что киназа Lyn является компонентом каскада в Fas-опосредованном апоптозе. Не только сигнальные молекулы, но и рецепторы на поверхности клетки, включая Fas, могут обуславливать как пролиферацию, так и ее апоптоз [Alderson M.R., 1993]. Выявлено, что Lyn может влиять как на гибель эозинофила, так и на процесс его выживания [Simon H.U., 1998]. Механизмы данного явления остаются неясными, доказан лишь тот факт, что активация Lyn-Ras-Raf-1-MAP-киназ является облигатной в ингибировании цитокин-опосредованного апоптоза эозинофилов [Simon H.U., 1997].

Известно, что TNFR1 содержит цитоплазматические домены, ответственные за проведение сигнала гибели и называемые «death domains» (DD) [Boldin M.P., 1995]. После связывания с соответствующим лигандом рецептор формирует гомотримерный комплекс, в результате чего DD оказываются ассоциированными. В последующем происходит взаимодействие DD рецептора TNFR1 с адаптерным белком TRADD (TNFR1 associated death domain), который содержит собственный DD на С-концевом участке [Hsu H., 1995]. Кроме этого, TRADD может взаимодействовать с белками TRAF (TNF receptor-associated factor), FADD/MORT1 и RIP (receptor interacting proteins). Образование комплекса TRADD-TRAF приводит к активации транскрипционных факторов NF- $\kappa$ B и киназы JNK. В свою очередь комплекс TRADD-FADD необходим для запуска апоптоза, а взаимодействие TRADD-RIP необходимо для передачи сигналов, активирующих как NF- $\kappa$ B и JNK, так и гибель клеток [Казначеев К.С., 1999; Самуилов В.Д., 2000; Потапнев М.П., 2002; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006].

На сегодняшний день установлена роль гена p53 в реализации запрограммированной гибели клеток. P53 запускает программу апоптоза при

наличии нерепарированных повреждений ДНК. Ген p53 находится на коротком плече хромосомы 17 и кодирует образование ядерного белка, состоящего из 393 аминокислот, с молекулярной массой 53 кДа. Тетрамер функционирует как транскрипционный фактор, связываясь своим карбоксильным окончанием со специфическими регионами генов-мишеней [Мойбенко А.А. и соавт., 2005]. Белок P53 находится в цитоплазме в неактивном состоянии и в случае активации способен инициировать независимо друг от друга две программы: временную остановку клеточного цикла в G<sub>1</sub>-фазе с помощью белка p21<sup>WAF1</sup>, ингибирующего циклинзависимые киназы, и стимуляцию апоптоза путем активации генов bax или bid – проапоптотических генов семьи Bcl-2 и/или активации образования свободных форм кислорода, способствующих освобождению цитохрома c из митохондрий [Лукьянова Н.Ю. и соавт., 2000; Владимирская Е.Б., 2002; Антонов В.Г., Козлов В.К., 2004; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006].

В настоящее время установлено, что существуют несколько сигнальных путей в реализации апоптоза. В первую очередь, это кальций-зависимый путь передачи сигнала, который активируется при действии ряда цитокинов и глюкокортикоидов на различные клетки. В результате индукции в клетке происходит активация протеинкиназы C, приводящая к образованию ряда вторичных мессенджеров. Важное значение придается инозитолтрифосфату, который способствует выходу кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль, что приводит к активации Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-зависимой эндонуклеазы, разрушению цитоскелета и образованию апоптотических телец путем активации Ca<sup>2+</sup>-зависимой протеазы кальпаина и др. [Белушкина Н.Н., Северин С.Е., 1998; Суханова Г.А., Акбашева О.Е., 2006].

Другой путь – индукция сфингомиелиназы, необходимой для активации апоптоза IL-1, TNF и в Fas-индуцируемых системах. Этот путь начинается с ферментативного гидролиза сфингомиелина до фосфатидилхолина и церамида [Суханова Г.А., Акбашева О.Е., 2006]. Мишенями действия церамида являются многие внутриклеточные ферменты и факторы

транскрипции – церамидактивируемая протеинкиназа (САРК), протеинфосфатаза 2А, митогенактивируемая протеинкиназа (ERK/МАРК), стрессактивируемая протеинкиназа (JNK/SАРК), NF-κВ, АР-1, протеинкиназа С, фосфолипаза D и катеписин D. Так, церамид активирует САРК, которая в последующем фосфорилирует проапоптотические белки семейства Bcl-2. Под действием церамида активируются протеинкиназа С и фосфолипаза А<sub>2</sub>, которые способствуют перераспределению фосфатидилсерина на поверхность клетки [Мойбенко А.А. и соавт., 2005; Ипатова О.М. и соавт., 2006].

Следующий сигналпередающий путь активации апоптоза – образование активных форм кислорода (АФК). Роль этих веществ до конца не исследована, известно, что они служат важными внутриклеточными мессенджерами [Los M., 1995]. АФК представляют собой высокоактивные метаболиты, генерируемые клеткой в процессе нормальной жизнедеятельности. При этом существует ряд внутриклеточных систем, направленных на ограничение и нейтрализацию повреждающего действия этих молекул. Многие агенты, провоцирующие развитие апоптоза клеток, являются оксидантами или стимулируют окислительные процессы; в то же время многие ингибиторы апоптотической гибели проявляют антиоксидантную активность [Buttke T.M., 1994]. Так, например, в эксперименте тиоловые антиоксиданты N-ацетилцистеин и глутатион блокировали гибель Т-клеток гибридомы [Sandstrom P.A., 1994], а диметилсульфоксид и о-фенантролин ингибировали эндотоксин-зависимый апоптоз эндотелиальных клеток [Abello P.A., 1994]. Было показано, что FasL, являющийся важным медиатором апоптотической гибели многих типов клеток, реализует свой эффект посредством кислород-зависимого пути [Um H.-D., 1996]. Установлено, что в Fas-резистентных опухолевых клеточных линиях уменьшение внутриклеточной концентрации радикалов кислорода повышает чувствительность FasR, в то время как увеличение количества супероксид-

анионов отменяет Fas-ассоциированный апоптоз этих клеток [Clement M.-V., 1996].

При переносе электронов по дыхательной цепи митохондрий в комплексах I и III часто происходит «утечка» электронов на кислород, в результате чего образуются активные формы кислорода. Супероксид-анионы в клетке подвергаются дальнейшим превращениям в перекись водорода под действием  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -зависимой или  $\text{Mn}^{2+}$ -зависимой супероксиддисмутазы. В последующем она обезвреживается каталазой или глутатион-пероксидазой [Wedi B. et al., 1999]. АФК, не нейтрализованные антиоксидантными системами, вызывают значительные изменения клеточных структур: деструкцию ДНК, повреждение белковых и липидных молекул. Показано, что образование АФК вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий и одновременный выход цитохрома *c* [Бра М. и соавт., 2005; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006].

На сегодняшний день известно, что в запуске и развитии процесса апоптоза центральная роль принадлежит протеазам. Осуществляя деструкцию клеточных структур, они расщепляют белки-мишени в области расположения аспарагиновых оснований. Эта группа протеаз, названная каспазы (caspases), существует обособленно и функционирует как медиатор сигнала смерти. Каспазы имеют высокую степень гомологии по своей аминокислотной последовательности, схожи по структуре и по субстратной специфичности и синтезируются в виде проферментов (30-50 кДа), которые содержат 3 домена: N-концевой домен, большую (20 кДа) и малую субъединицы (10 кДа). Было установлено, что во время активации каспазы подвергаются протеолитическому отщеплению N-концевого домена. Большая и малая субъединицы разъединяются и образуют комплекс, состоящий из двух гетеродимеров субъединиц. В литературе описаны 14 каспаз, нумерация которых соответствует хронологическому порядку их открытия. Каспазы также содержат 2 модульных участка, которые опосредуют их взаимодействие с адаптерными белками: эффекторный домен



смерти (DED, death effector domain) и домен мобилизации каспаз (CARD, caspase recruitment domain) [Фильченков А.А., 2003; Суханова Г.А., Акбашева О.Е., 2006].

Один из путей активации каспаз связан с взаимодействием индуктора апоптоза со специфическими рецепторами (например, активация каспазы-8 при взаимодействии FasL с FasR). В свою очередь, другой путь - активация каспазы-9 в результате образования гетеродимеров белками семейства Bc1-2. И, наконец, третий путь активации каспаз - при помощи гранзима В - сериновой протеазы. Такой путь активации каспаз актуален в случае индукции апоптоза клетки цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые и секретируют эти ферменты. При этом необходимо присутствие порообразующих белков перфоринов, продуцируемых также цитотоксическими Т-лимфоцитами. В качестве мишеней гранзима В известны каспазы 1, 3 и 9 [Владимирская Е.Б., 2002; Фильченков А.А., 2003].

Как указывалось ранее, каспазы осуществляют деструкцию клеточных структур [Widmann С., 1998]. Это, по-видимому, обеспечивается рядом механизмов. Так, каспазы обладают способностью инактивировать ингибиторы апоптоза: нуклеаза, расщепляющая ДНК (CAD), находится в неактивном, связанном состоянии с белком ингибитором (ICAD). Каспазы 3 и 7 расщепляют ICAD, высвобождая нуклеазу CAD. Другим механизмом действия каспаз можно назвать прямое расщепление структурных белков клетки. Каспаза 6 разрушает ядерный ламин, организующий структуру хроматина, что приводит к конденсации хроматина. Кроме того, каспазы вызывают нарушение регуляции белкового синтеза, что ведет к расщеплению белков, контролирующих структуру цитоскелета. Известно, что, расщепляя гельзолин – белок, регулирующий натяжение нитей актина, каспазы разрушают цитоскелет. И, наконец, каспазы способствуют инактивации и дизрегуляции белков, вовлеченных в репарацию ДНК (DNA-PK<sub>cs</sub>), образование мРНК (U1-70K) и репликацию ДНК (репликационный фактор С) [Белушкина Н.Н., Северин С.Е., 2001; Владимирская Е.Б., 2002]. Поэтому

каспазы составляют центральный компонент программы апоптоза: их активация приводит к финальной стадии гибели клеток, а именно – к фрагментации ДНК и деградации структурных белков цитоскелета и клеточных мембран, а также к инактивации других белков, обеспечивающих нормальное функционирование клетки [Олейник Е.К. и соавт., 2004].

По данным литературы, белки, входящие в семейство Bcl-2, являются модуляторами апоптотической гибели: некоторые из них (bcl-2, bcl-xL, Mcl-1, bcl-w) препятствуют развитию апоптоза, тогда как другие (bax, bak, bid, bad, bcl-xS), наоборот, - служат промоторами этого процесса [Voise L.H., 1993; Kroemer G., 1997]. Наиболее хорошо изученным из всех генов данного семейства является ген bcl-2, продукт которого экспрессируется преимущественно на мембране митохондрий. Исследования показывают, что экспрессия bcl-2 может блокировать апоптоз, индуцированный рядом сигналов, в том числе ионизирующей радиацией, химиотерапевтическими препаратами, удалением факторов роста, стероидами. Bcl-2 также защищает клетку от апоптоза, регулируемого p53, что предполагает супрессию апоптотического сигнала и имеет место при опухолевой трансформации. Экспрессия bcl-2 может способствовать онкогенезу: он способен трансформировать клетки в кооперации с c-тус. Это наблюдается в некоторых типах опухолей, например, при некоторых видах лимфом и лейкозий, нейробластомах и карциномах предстательной железы. Кроме этого, ряд исследователей полагают, что повышенная экспрессия bcl-2 обуславливает резистентность опухолей к воздействию противоопухолевых препаратов и облучению, поскольку гибель опухолевых клеток при этих воздействиях происходит по механизму апоптоза и коррелирует с неблагоприятным прогнозом [Campos L., 1993; Уманский С.Р., 1996; Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В., 1996; Karakas T., 1998; Лукьянова Н.Ю., 2000].

Что касается белка bad, то известно, что он участвует в запуске апоптоза за счет образования гетеродимера с белком bcl-2 и высвобождения митохондриальных факторов [Белушкина Н.Н., Северин С.Е., 2001].

Известно, что в мембранах митохондрий присутствуют такие белки, как протеаза AIF (apoptosis inducing factor) и цитохром *c*. Эти факторы покидают митохондрии посредством крупных мегаканалов, образующихся при взаимодействии митохондриальной мембраны с bad [Kluck R.M., 1997; Kroemer G., 1997]. В цитозоле цитохром *c* связывается с Araf-1 (апоптотический протеазоактивирующий фактор), повышая сродство последнего к АТФ, что способствует конформационному переходу с высвобождением каспаз-связывающего домена (CARD) в Araf-1 [Маянский Н.А., 2004; Бра М. и соавт., 2005; Мойбенко А.А. и соавт., 2005; Черняк Б.В. и соавт., 2005; Суханова Г.А., Акбашева О.Е., 2006]. Этот домен взаимодействует с прокаспазой-9, вызывая образование активного фермента, который затем активирует каспазы-3 и -7 [Li P., 1997; Cain K., 1999; Фильченков А.А., 2003]. В образуемый протеолитический каскад включаются также прокаспазы -2, -6, -8 и -10, что приводит к разрушению клетки [Суханова Г.А., Акбашева О.Е., 2006].

Таким образом, апоптоз представляет собой сложный многокомпонентный процесс, необходимый для нормального развития клеток, поддержания тканевого гомеостаза и удаления поврежденных элементов. При этом особого внимания заслуживает цитокинопосредованный апоптоз в связи с важностью установления механизмов межклеточных взаимодействий.

### **1.2.2 Общие представления о цитокинопосредованной регуляции апоптоза клеток**

Цитокины – большая группа веществ полипептидной природы, обладающих широким спектром биологических свойств. В настоящее время к ним относят более 200 веществ, в том числе интерфероны, колониестимулирующие факторы, интерлейкины, хемокины, семейство фактора некроза опухолей, трансформирующие ростовые факторы и др., индуцирующие и регулирующие такие физиологические и патологические процессы, как рост, пролиферация, старение клеток, апоптоз, гемопоэз, воспаление,

иммунный ответ, метаболизм, регенерация тканей и др. Цитокины могут как стимулировать, так и ингибировать указанные процессы, действовать как синергисты и антагонисты, вызывать каскад цепных реакций. Цитокины многофункциональны, универсальны, плеiotропны. Плеiotропность заключается в способности одних и тех же цитокинов взаимодействовать с рецепторами, экспрессированными разными клетками организма. Цитокины со сходным строением могут оказывать различное биологическое действие, а разные в структурном отношении цитокины могут вызывать близкий и даже одинаковый эффект [Луговская С.А., 1997; Кашкин К.П., 1998; Хаитов Р.М., 2000; Гольдберг Е.Д., 2001; Фрейдлин И.С., 2001; Симбирцев А.С., 2004; Ершов Ф.И., 2006].

Взаимодействуя между собой, цитокины образуют комплексную сетевую систему, в рамках которой биологические свойства отдельных цитокинов могут существенно изменяться. Цитокиновая сеть представляет собой универсальную систему, запускающую и регулирующую целый каскад воспалительных, иммунных и метаболических процессов, направленных на нейтрализацию и элиминацию патогенных агентов. Эта биологическая система обладает свойством взаимозаменяемости биологического действия, а также сочетания аутокринной и паракринной регуляции. Следует подчеркнуть, что конкретным цитокинам присущи определенные свойства, выработанные в процессе эволюции. Однако действие в отношении клетки-мишени реализуется в виде комбинаций и последовательностей эффектов цитокинов [Фрейдлин И.С., 1995, 2001; Луговская С.А., 1997; Васильева Г.И., 2000; Хаитов Р.М., 2000; Царегородцева Т.М., 2003; Ешану В.С., 2004; Иванов А.А. и соавт., 2005]. Взаимодействие цитокинов характеризуется синергизмом (например,  $\text{TNF}\alpha$  и  $\text{IFN}\gamma$ ) или антагонизмом ( $\text{IL-4}$  и  $\text{IFN}\gamma$ ). Сбалансированность цитокиновой регуляции основывается на равновесии альтернативных по биологическим свойствам пулов молекул, нарушение которого ведет к развитию патологии [Фрейдлин И.С., 2001].

В настоящее время определен ряд цитокинов, обладающих апоптоз-регулирующей функцией. К их числу прежде всего относятся IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  (табл. 2).

Известно, что провоспалительный цитокин IL-1 обладает широким спектром действия. Основным источником данного цитокина являются мононуклеары различной тканевой принадлежности. Для синтеза IL-1 необходима активация последних различными индукторами, в частности компонентами клеточной стенки бактерий [Greenbaum L.A., 1988]. IL-1 усиливает пролиферацию CD4 $^{+}$ -клеток, рост и дифференцировку В-лимфоцитов, индуцирует продукцию IL-2 и экспрессию его рецептора, способствует активации продукции антител, обладает прямым токсическим действием на раковые клетки и клетки, инфицированные вирусами, стимулирует продукцию IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, RANTES, GM-CSF, IFN- $\gamma$  и TNF различными клетками. Согласно современным данным, существуют три изоформы IL-1 –  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$  [Намазова Л.С. и соавт., 2000; Кадагидзе З.Г., 2003].

При изучении влияния IL-1 на программированную гибель клеток, была установлена его способность предотвращать апоптотическую гибель моноцитов [Mangan D. et al., 1991]. В исследовании F. Colotta et al. [1992] было установлено, что IL-1 $\beta$  увеличивает выживание полиморфноядерных лейкоцитов, угнетая их апоптоз. В реализации антиапоптотического эффекта этого медиатора, по-видимому, участвует ядерный фактор NF- $\kappa$ B, активация которого наблюдается при связывании IL-1 с соответствующим рецептором [Ковальчук Л.В. и соавт., 2001]. Активность другого фактора - AP-1 также может быть индуцирована упомянутым цитокином, вероятно, посредством активации протеинкиназы C [Muegge K. et al., 1989].

IL-2, наряду с IL-1, является важным провоспалительным цитокином, который стимулирует пролиферацию и дифференцировку активированных Т-лимфоцитов в эффекторные клетки. Он продуцируется в основном CD4 $^{+}$ -лимфоцитами. Продукция IL-2 является индуцибельной: покоящиеся

## Спектр цитокинов - регуляторов апоптоза

Цитокин	Влияние на апоптоз	Молекулярные механизмы	Авторы
Интерлейкин-1	↓ апоптоза <i>моноцитов</i>	Активация NF-κB, AP-1	Muegge K. et al., 1989; Mangan D. et al., 1991; Ковальчук Л.В. и соавт., 2001
Интерлейкин-2	↓ апоптоза <i>T-лимфоцитов</i>	Активация генов <i>c-myc</i> , <i>bcl-X</i> , <i>bcl-2</i> , <i>CIS</i> ; белка <i>Stat5a</i> и <i>PI3K</i>	Estaquier J., Ameisen C., 1997; Потапнев М.П., 2002; Lotem J., Sachs L., 2002; Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., 2005
	↑ апоптоза <i>T-лимфоцитов</i>	Увеличение экспрессии лигандов и рецепторов <i>Fas</i> и <i>TNFα</i> , образования <i>DISC</i> -комплекса; ингибирование синтеза <i>c-FLIP</i>	Потапнев М.П., 2002
Интерлейкин-3	↓ апоптоза <i>эозинофилов</i>	Активация <i>PI3K</i> , <i>Ras-MAPK</i> , транскрипционных факторов <i>c-fos</i> , <i>c-jun</i> , фосфорилирование <i>bad</i> , нарушение переноса <i>bax</i> к митохондриям, экспрессия <i>bcl-2</i> или <i>bcl-x<sub>L</sub></i>	Dorsch M. et al., 1994; Kinoshita T., 1995; Perkins G.R. et al., 1996; Del Peso L. et al., 1997; Leverrier Y. et al., 1997; Nagata Y., Todokoro K., 1997; Wang J.M. et al., 1999
Интерлейкин-4	↓ апоптоза <i>лимфоцитов, тучных клеток</i>	Активация <i>PI3K</i> , <i>JAK-STAT6</i>	Brunetti M. et al., 1995; Yanagida M. et al., 1995; Estaquier J., Ameisen C., 1997
	↑ апоптоза <i>моноцитов</i>		

Цитокин	Влияние на апоптоз	Молекулярные механизмы	Авторы
Интерлейкин-5	↓ апоптоза <i>эозинофилов</i>	Активация PI3K, JAK-STAT, Ras-MAPK, транскрипционных факторов c-fos, c-jun, увеличение экспрессии bcl-2, bcl-x <sub>L</sub>	Yousefi S. et al., 1994, 1996; Bates M.E. et al., 1996; Ochiai et al., 1997; Ogata N. et al., 1997; Dibbert B. et al., 1998; Pazdrak K. et al., 1998
TNF $\alpha$	↑ апоптоза	Запуск каскада каспаз; образование церамида; образование АФК	Маянский Н.А., 2002; Потапнев М.П., 2002
	↓ апоптоза <i>моноцитов, T-лимфоцитов</i>	Активация NF- $\kappa$ B	Потапнев М.П., 2002; Мойбенко А.А. и соавт., 2005
IFN $\gamma$	↑ апоптоза <i>моноцитов</i>	JAK- STAT1	Estaquier J., Ameisen C., 1997 Colotta F. et al., 1992; Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., 2005; Ершов Ф.И., 2006
	↓ апоптоза <i>гранулоцитов</i>		
GM-CSF	↓ апоптоза <i>эозинофилов</i>	Активация PI3K, Ras-MAPK, транскрипционных факторов c-fos, c-jun, повышение экспрессии bcl-x <sub>L</sub>	Tai P.C. et al., 1991; Corey S. et al., 1993; Dibbert B. et al., 1998

Примечание: ↓ - угнетение, ↑ - усиление, АФК – активные формы кислорода, PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа.

лимфоциты не экспрессируют ген IL-2. Для осуществления биологического эффекта IL-2 связывается со специфическим мембранным рецептором, экспрессированным на Т- и В-лимфоцитах, НК-клетках, моноцитах и макрофагах [Симбирцев А.С., 1998; Намазова Л.С. и соавт., 2000; Кадагидзе З.Г., 2003].

Известно, что IL-2 в отношении активированных Т-клеток может выступать в качестве как проапоптотического, так и антиапоптотического фактора. Т-клетки, стимулированные антигеном или митогеном, погибают, если их лишить IL-2. М. Brunetti et al. [1995] установили, что IL-2 существенно блокирует спонтанный и глюкокортикоид-индуцированный апоптоз Т-лимфоцитов. В исследованиях J. Estaquier и С. Ameisen [1997] IL-2 ингибировал апоптотическую гибель моноцитов, вызванную разнообразными стимулами: добавлением IL-10 или IFN- $\gamma$  в высокой концентрации. Примечательно, что в случае отсутствия активирующего влияния IL-2 гибель клетки может быть предотвращена добавлением любого из цитокинов, рецепторы которых имеют общую  $\gamma$ -цепь - IL-4, IL-7 и IL-15. Очевидно, что защитный сигнал в этом случае передается через  $\gamma$ -цепь [Симбирцев А.С., 1998; Ярилин А.А., 1998]. Антиапоптотический эффект реализуется несколькими механизмами, включающими действие белка Stat5a и антиапоптотических генов c-myc, Bcl-X, Bcl-2 и CIS (cytokine induced Src homology 2 protein), относящихся к группе эндогенных супрессоров цитокиновых сигналов, и активацию PI3K/Akt, блокирующей каскад каспаз разобщением каспазы-9 с APAF-1, а также стимулирующей ингибиторы апоптоза (IAPs, XIAP) и иницирующую NF- $\kappa$ B [Потапнев М.П., 2002; Lotem J., Sachs L., 2002; Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., 2005]. Как проапоптотический фактор, IL-2 увеличивает образование DISC-комплекса и подавляет синтез ингибитора апоптоза c-FLIP, усиливает экспрессию рецепторов и лигандов Fas и TNF $\alpha$ , стимулирует входение Т-клеток в пролиферацию (при этом клетки наиболее чувствительны к индукции апоптоза в поздней G<sub>1</sub>- и S-фазе клеточного цикла) [Потапнев М.П., 2002]. Наличие этого цитокина



обуславливает пролиферацию Т-клеток, обеспечивающих реализацию иммунного ответа. Однако в ходе иммунных реакций чувствительность Т-лимфоцитов к действию ИЛ-2 снижается, что связано с угнетением экспрессии рецептора данного цитокина на мононуклеарах, напрямую зависящую от наличия антигенного воздействия через Т-клеточный рецептор (TCR). В этом заложен существенный биологический смысл: элиминация антигена обуславливает падение уровня секретируемого ИЛ-2 и экспрессии его рецепторов, а, следовательно, Т-лимфоциты подвергаются апоптозу, связанному с дефицитом цитокинового сигнала, угнетается их пролиферация. Это обеспечивает своевременное ограничение иммунных реакций, связанное с гибелью патогена, а также дает возможность пролиферировать только тем клонам лимфоцитов, которые специфичны в отношении конкретного антигена без вовлечения в пролиферацию большинства других клонов [Симбирцев А.С., 1998].

ИЛ-3 – мультиколониестимулирующий фактор, обеспечивает пролиферацию и дифференцировку всех гемопоэтических ростков. Основными продуцентами этого цитокина являются активированные Т-лимфоциты и тучные клетки. В отношении эозинофилов ИЛ-3 не только обеспечивает ранние этапы созревания клеток, но и участвует в их активации, повышает выброс белков гранул. В исследованиях *in vitro* установлено, что ИЛ-3 увеличивает выживание эозинофильных гранулоцитов [Tai P.C., et al., 1991], а также тучных клеток [Yanagida M., et al., 1995], регулируя процесс их программированной гибели.

ИЛ-3 активирует фосфатидилинозитол-3-киназу (Phosphatidylinositol-3-kinase - PI3K), принимающую участие в различных процессах: транспорт глюкозы, окислительный стресс, передача митогенных сигналов и др. [Sato N. et al., 1993; Gold M.R., 1994; Sato S. et al., 1994]. В исследовании L. del Peso [1997] было показано, что трансдукция сигнала при связывании ИЛ-3 с родственным рецептором включает следующие этапы: PI3K → Akt → Bad.

Фосфорилирование Bad после стимуляции IL-3 раскрывает механизм антиапоптотического эффекта данного медиатора [Zha J. et al., 1996].

Наряду с этим существуют данные, что IL-3 реализует антиапоптотический эффект посредством экспрессии Bcl-2 или Bcl-X<sub>L</sub> [Kinoshita T., 1995; Perkins G.R. et al., 1996; Leverrier Y. et al., 1997; Wang J.M. et al., 1999].

Помимо вышеперечисленного, в механизмы сигнальной трансдукции IL-3 вовлечен JAK-STAT путь, в котором преимущественно используются гомологи STAT5, в настоящее время известные как STAT5A и STAT5B [Mui A.L. et al., 1995]. Помимо STAT5, при связывании лиганда с рецептором активируются STAT1, STAT3 и STAT6 [Caldenhoven E. et al., 1995; Quelle F.W., 1995; Brizzi M.F., 1996; Nagata Y., 1996]. И, наконец, IL-3 активирует различные MAP-киназы, в том числе Ras, Raf и ERK [Okuda K. et al., 1992; Raines M.A., 1992; Welham M.J. et al., 1992; Nagata Y. et al., 1997; Foltz I.N., Schrader J.W., 1997].

IL-4 продуцируется субпопуляцией Th2 лимфоцитов, принимает участие в гуморальном иммунном ответе и осуществляет свое действие через специфический рецептор, выявленный на покоящихся T- и B-лимфоцитах, базофилах, тучных клетках, нейтрофилах, а также макрофагах [Ohara J., Paul W.E., 1987; Park L.S. et al., 1987]. IL-4 повышает экспрессию молекул гистосовместимости II класса и антиген-презентирующую способность макрофагов. Наряду с этим этот интерлейкин ингибирует синтез последними провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) и MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ), образование высокоактивных метаболитов кислорода, азота, в связи с чем ограничивает распространенность и интенсивность воспаления [Chung K.F, Barnes P.J., 1999; Фрейдлин И.С., 2001]. IL-4 поддерживает жизнеспособность и рост интактных T-клеток [Paul W.E., Seder R.A., 1994], их дифференцировку в Th2-лимфоциты [Le Gros G. et al., 1990; Swain S.L. et al., 1990; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995], а также является мощным ростовым фактором для B-лимфоцитов [Медуницын Н.В., 1999; Фрейдлин И.С., 2001], обуславливая пролиферацию

не только нормальных, но и злокачественно трансформированных В-клеток [Потапнев М.П., 1994]. IL-4 также обеспечивает синтез иммуноглобулинов В-лимфоцитами и играет центральную роль в переключении плазматических клеток на синтез IgG4 и IgE [Медуницын Н.В., 1999; Chung K.F, Barnes P.J., 1999]. Совместно с IL-3 этот цитокин стимулирует созревание базофильных и эозинофильных лейкоцитов [Favre C. et al., 1990].

Установлено, что клетки большинства опухолей человека продуцируют IL-4 и его рецепторы, отличающиеся высокой афинностью. Связывание IL-4 с соответствующим рецептором приводит к подавлению роста опухоли. Механизм противоопухолевого действия IL-4 недостаточно изучен. Полагают, что это может быть обусловлено прямым антипролиферативным действием, обусловленным блокадой клеточного цикла, или его способностью снижать экспрессию некоторых цитокинов. Кроме того, допускается, что под влиянием IL-4 повышение экспрессии антигенов HLA способствует развитию противоопухолевого иммунного ответа [Кадагидзе З.Г., 2003].

В отношении запуска реализации запрограммированной гибели клеток IL-4 обладает разнонаправленными эффектами. С одной стороны, известно, что этот цитокин увеличивал число апоптотически измененных моноцитов [Estaquier J., Ameisen C., 1997], а с другой, - рядом авторов было отмечено его антиапоптотическое действие. Так, IL-4, добавленный к клеточной культуре, пролонгировал время жизни тучных клеток [Yanagida M. et al., 1995], а также защищал CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты от спонтанного и вызванного кортикостероидами апоптоза [Brunetti M. et al., 1995].

Биологическое действие этот медиатор осуществляет посредством связывания с рецептором IL-4R, состоящим из двух субъединиц – α-цепи, взаимодействующей с высокой аффинностью и обеспечивающей реализацию всех функций цитокина, и общей с IL-2R γ-цепи, роль которой состоит в усилении проводимого сигнала [Kondo M. et al., 1993; Russell S.M. et al., 1993]. Вслед за связыванием лиганда с рецептором в клетке происходит активация фосфатидилинозитол-3-киназы [Imani F. et al., 1997], а также JAK-

STAT пути с привлечением STAT6 [Kaplan M.H. et al., 1996; Takeda K. et al., 1996; Кетлинский С.А., 2002; Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., 2005].

IL-5 – цитокин, обеспечивающий созревание и дифференцировку эозинофильных лейкоцитов и В-лимфоцитов. Наряду с этим, он является одним из ключевых медиаторов, способствующих активации и дегрануляции эозинофилов, обладает свойствами эозинофильного хемоаттрактанта. Основными клетками-продуцентами данного цитокина являются Th2-лимфоциты, а также сами эозинофилы. Блокируя реализацию апоптотической гибели, IL-5 увеличивает время жизни ацидофильных гранулоцитов [Tai P.C. et al., 1991; Yamaguchi Y. et al., 1991] и тучных клеток [Yanagida M. et al., 1995]. Антиапоптотический эффект IL-5 реализуется активацией ряда внутриклеточных молекул MEK-МАРК, PI3K-АКТ, а также JAK-STAT5 [Gold M.R. et al., 1994; Sato S. et al., 1994; Yousefi S. et al., 1994, 1996; Alam R. et al., 1995; Mui A.L. et al., 1995; van der Bruggen T. et al., 1995; Bates M.E. et al., 1996; Ogata N. et al., 1997; Adachi T., Alam R., 1998; Caldenhoven E. et al., 1998; Coffey P.J. et al., 1998; Pazdrak K. et al., 1998; Huang H.M. et al., 2000].

TNF $\alpha$  является ключевым провоспалительным цитокином, обладающим широким спектром биологического действия. Основными его источниками являются макрофаги, клетки Купфера, моноциты, лимфоциты, фибробласты и др. [Кадагидзе З.Г., 2003]. Особенностью биологического действия TNF $\alpha$  является мощная ингибиция пролиферации Т- и В-лимфоцитов и естественных киллеров, угнетение функциональной активности макрофагов и лимфоцитов, а также стимуляция роста фибробластов и синтеза коллагена [Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Луговская С.А., 1997; Воробьев А.И., 2002].

Известно, что одним из классических путей индукции апоптоза клетки является TNF $\alpha$ -зависимый путь, реализуемый при связывании лиганда со специфическим рецептором TNF $\alpha$  I типа (TNFR1). При этом последовательность реакций выглядит так: TNFR1  $\rightarrow$  TRADD  $\rightarrow$  FADD  $\rightarrow$  прокаспаза-8  $\rightarrow$  каскад каспаз или TRADD  $\rightarrow$  RIP  $\rightarrow$  RAIDD  $\rightarrow$  прокаспаза-2  $\rightarrow$  каскад

каспаз или TRADD → FADD → кислая сфингомиелиназа → церамид → JNK [Самуилов В.Д., 2000; Потапнев М.П., 2002; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006]. Наряду с классическим механизмом запуска программированной гибели клетки, сопряженным с активацией эффекторных каспаз, TNF $\alpha$  обладает способностью индуцировать апоптоз каспазозависимым путем с образованием в митохондриях активных форм кислорода, известных своей способностью напрямую повреждать нуклеиновые кислоты, белки и липиды [Маянский Н.А., 2002].

В то же время в литературе существуют данные, согласно которым TNF $\alpha$  может выступать не только в роли индуктора апоптотической гибели, но и ингибировать этот процесс. Так, в исследовании D. Mangan et al., [1991] было установлено, что вышеуказанный цитокин предотвращает апоптоз моноцитов крови. В свою очередь, добавленный *in vitro* к Т-лимфоцитам TNF $\alpha$  является костимулирующим фактором, повышающим их жизнеспособность, пролиферацию и генерацию из клеток-предшественников. При этом антиапоптотический эффект опосредуется цепочкой: TNFR1 → TRADD → RIP → NIK-киназа → NF- $\kappa$ B или TNFR2 → TRAF1/2 → NIK-киназа → NF- $\kappa$ B. Наряду с этим, антиапоптотическое действие TNF $\alpha$  может не зависеть от NF- $\kappa$ B и быть связанным с индукцией внутрицитоплазматической молекулы SODD, взаимодействующей с «доменом смерти» TNFR1 и удерживающей рецептор в неактивной форме [Зубова С.Г., Окулов В.Б., 2001; Потапнев М.П., 2002; Мойбенко А.А. и соавт., 2005].

IFN $\gamma$  - цитокин с широким диапазоном биологических свойств, оказывающий противовирусный, иммунорегуляторный и антипролиферативный эффект. Его продуцентами являются Th1-лимфоциты, цитотоксические Т-лимфоциты и НК-клетки [Хаитов Р.М., 2000]. IFN $\gamma$  – активатор макрофагов и НК-клеток, стимулирует реакции клеточного иммунного ответа, фагоцитоз, адгезивную и цитокинсинтетическую функцию макрофагов [Billiau A., Dijkmans R., 1990; Кетлинский С.А., Калинина Н.М., 1995; Фрейдлин И.С., 1995, 2001; Симбирцев А.С., 2004]. Анализ сигнальной трансдукции

позволил установить, что при связывании IFN $\gamma$  с соответствующим рецептором происходит активация Jak1- и Jak2-киназ в области цитоплазматической части рецептора с последующим вовлечением транскрипционного фактора STAT1 [Durbin J.E. et al., 1996; Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., 2005; Ершов Ф.И., 2006].

Известно, что IFN $\gamma$  обладает способностью увеличивать выживаемость полиморфноядерных лейкоцитов, ингибируя их апоптоз [Colotta F. et al., 1992]. Но, наряду с этим, было установлено, что этот медиатор, добавленный к культуре моноцитов, увеличивал число апоптотически измененных клеток, что было связано с секрецией IL-10 и отменялось действием антител к IL-10 [Estaquier J., Ameisen C., 1997].

В отношении индукции IFN $\gamma$  апоптоза в опухолевых клетках известно, что он способен усиливать цитотоксическую и апоптозиндуцирующую активность противоопухолевых лекарственных средств. Исследование было выполнено с использованием интактных и трансфицированных геном Bcl-2 клеток HeLa и MCF7, при этом добавление в культуру одновременно с противоопухолевыми препаратами IFN $\gamma$  усиливало цитотоксическое и апоптозиндуцирующее действие этих лекарственных средств. Следует отметить, что указанный эффект был существенно более выраженным в отношении клеток, гиперэкспрессирующих ген bcl-2, а также различался в зависимости от дозы препаратов: усиление как цитотоксического, так и апоптозиндуцирующего действия лекарств интерфероном проявлялось лишь в отношении низких и средних их концентраций, убивающих опухолевые клетки апоптотическим путем, но не в отношении высоких доз, вызывающих некротическую гибель [Славина Е.Г., 2000; Кадагидзе З.Г., 2003].

GM-CSF продуцируется широким спектром различных клеток, включая макрофаги, эндотелиальные клетки, активированные Т-лимфоциты, эозинофилы и др. Кроме активности, связанной со стимуляцией роста различных клеток, этот цитокин также индуцирует дифференцировку гранулоцитов и макрофагов, повышает функциональную активность

нейтрофилов [Ешану В.С., 2004]. GM-CSF обладает способностью ингибировать апоптотическую гибель гранулоцитов [Brach M.A. et al., 1992; Colotta F. et al., 1992; Wei S. et al., 1996]. Антиапоптотическое действие реализуется путем активации Map-киназ, а также вовлечением фактора транскрипции STAT3 [Okuda K. et al., 1992; Foltz I.N., Schrader J.W., 1997]. GM-CSF активирует PI3K [Sato N. et al., 1993; Gold M.R. et al., 1994]. Свой вклад в ингибицию апоптоза клеток вносит белок Bcl-x<sub>L</sub>. В исследовании В. Dibbert et al. [1998] экспрессия Bcl-x<sub>L</sub> повышалась в ответ на стимуляцию GM-CSF эозинофилов *in vitro*, но затем быстро снижалась при культивировании клеток вне цитокиновой поддержки.

Таким образом, механизмы формирования эозинофилии крови могут быть обусловлены повышением продукции цитокинов, действующих специфически в отношении эозинофильных лейкоцитов, а также нарушением реализации запрограммированной гибели последних. Следует отметить, что исследованы далеко не все аспекты нарушения цитокиноопосредованного апоптоза эозинофилов. Изучение влияния эозинофилспецифичных цитокинов на реализацию запрограммированной гибели ацидофильных гранулоцитов позволит расширить представления о сущности эозинофилии, встречающейся при широком круге заболеваний.

Исходя из того факта, что при эозинофилиях нарушен цитокиновый баланс, закономерен интерес к роли нарушения цитокиноопосредованной регуляции апоптоза эозинофилов в патогенезе больших эозинофилий крови при описторхозе и лимфопролиферативных гематологических заболеваниях.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Характеристика объекта исследования

Объектом настоящей работы явились эозинофильные гранулоциты, полученные у пациентов с заболеваниями, сопровождающимися эозинофилией крови (более 15%) (лимфопролиферативные заболевания системы крови, описторхоз).

В работе представлены результаты комплексного обследования 196 человек (91 мужчины и 105 женщин в возрасте от 18 до 60 лет, средний возраст –  $34\pm 3$  лет). 89 больных (41 мужчины и 48 женщин в возрасте от 18 до 60 лет) с первичным обращением в стационар по поводу злокачественных заболеваний системы крови. Все пациенты с гемобластозами были обследованы до назначения терапии при поступлении в отделение гематологии Томской областной клинической больницы (главный врач – Заслуженный врач РФ Б.Т. Серых). У 82 человек (38 мужчин и 44 женщины в возрасте от 18 до 60 лет) был верифицирован описторхоз (острая и хроническая (суперинвазия, реинвазия) формы). Набор этого клинического материала проводился в инфекционном отделении госпитальных клиник ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (главный врач – Заслуженный врач РФ канд. мед. наук В.М. Шевелев, заведующая отделением – канд. мед. наук, доцент Н.С. Бужак). Включение больных в исследование осуществлялось при непосредственном участии заведующей отделением гематологии В.Ю. Гранкиной, врача-гематолога Е.Н. Кнутаревой, заведующего кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава д-ра мед. наук, профессора А.В. Лепехина и врача-ординатора клиники инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава канд. мед. наук Н.П. Чернышовой.

Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, а также злоупотребление алкоголем и наркотическая зависимость.



В контрольную группу были включены 25 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту (12 мужчин и 13 женщин в возрасте от 18 до 60 лет, средний возраст –  $28 \pm 4$  лет), не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля.

Материалом исследования являлась венозная кровь обследованных лиц, взятая утром до приема пищи (кровь стабилизировали гепарином - 25 Ед/мл).

### **2.1.1. Клиническая характеристика пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови**

Все больные со злокачественными заболеваниями системы крови, ассоциированными с эозинофилией, были разделены на три группы. Первую группу составили 20 пациентов с лимфогранулематозом (по МКБ-10 рубрика С81): из них 7 - со смешанно-клеточным вариантом заболевания (С81.2), 8 - с нодулярным склерозом (С81.1), 5 – с лимфоидным преобладанием (С81.0). Среди больных лимфогранулематозом, согласно классификации, принятой в 1971 г. в Ann Arbor, выделяли пациентов со II Бб стадией процесса (2 человека), III Аб стадией (8 пациентов) и III Бб стадией (10 больных). Верификация диагноза проводилась на основании данных морфологического и иммунофенотипического исследований гистологических препаратов (наличие в опухолевом очаге типичных многоядерных клеток Березовского-Штернберга с фенотипом CD15, CD30).

Во вторую группу обследованных были включены 24 пациента с множественной миеломой (рубрика С90.0 МКБ-10): их них 22 человека – с диффузно-очаговой формой миеломных инфильтратов, 2 - с диффузной формой миеломных инфильтратов. Диагноз миеломной болезни устанавливался на основании обнаружения плазмоклеточной инфильтрации костного мозга (число плазмочитов более 10%) и моноклональной Ig-патии (сывороточный М-компонент или белок Бенс-Джонса в моче), подтвержденных методами иммунохимического анализа сывороточных и мочевых иммуноглобулинов с привлечением метода иммунофиксации.

Третью группу обследованных составили 20 больных неходжкинскими лимфомами (рубрики С82 и С83 по МКБ-10): 12 человек с лимфомой из периферических (зрелых) клеток (6 – со зрелоклеточной лимфомой, 2 - с пролимфоцитарной, 2 - с лимфоцитарной, 2 - с В-мелкоклеточной), 2 - с В-крупноклеточной, 6 – с фолликулярной. При этом у 8 пациентов с неходжкинскими лимфомами отмечали III Аб стадию процесса, у 12 - III Бб стадию. При диагностике неходжкинских лимфом обязательной являлась гистологическая оценка субстрата опухоли, дополненная иммунологическим и цитогенетическим методами исследования.

Группу сравнения составили 25 пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови (из них: 9 больных лимфогранулематозом, 8 – множественной миеломой, 8 – неходжкинскими лимфомами), не сопровождавшимися эозинофилией, с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

### **2.1.2. Клиническая характеристика больных описторхозом**

Все обследованные пациенты с описторхозом были разделены на две группы. В первую группу были включены 30 лиц, страдающих острым описторхозом (рубрика В66 – описторхоз, по МКБ-10), подавляющее большинство которых составили новоселы Томской области – 24 человека: из них 20 заразились описторхозом при проживании в эпидемическом очаге до 1 года. Верификация диагноза острого описторхоза основывалась на данных эпидемиологического анамнеза (пребывание больного в местности, не благополучной по описторхозу; употребление необезвреженной рыбы семейства карповых); остром начале болезни, сопровождавшемся высокой температурой, аллергическими явлениями, болями в эпигастральной области и правом подреберье; характерных изменениях крови (эозинофилия ( $>15\%$ ), лейкоцитоз). Обязательным для постановки диагноза острого описторхоза у обследованных пациентов являлось обнаружение IgM к антигенам *O.felineus* в сыворотке крови с применением иммуноферментного анализа.

Согласно классификации описторхоза М.Э. Винникова и соавт. [1969, 1971], Н.Н. Озерецковской [2000], были выделены следующие клинические группы: 1) пациенты с тифоподобным вариантом течения инфекции – 10 человек; 2) пациенты с гепато-холангитическим вариантом течения – 12 человек; 3) пациенты с гастроэнтерологическим вариантом течения – 8 человек.

Анализ клинической картины у пациентов с тифоподобным вариантом течения острого описторхоза показал, что наиболее часто у пациентов выявлялся токсико-аллергический синдром (83%). Больные предъявляли жалобы на общую слабость, головную боль, ознобы, повышенное потоотделение, боли в суставах и мышцах. При осмотре выявлялась легкая субиктеричность, экзантема. Диспепсический синдром (непереносимость жирной пищи, тошнота, горечь во рту, изжога, метеоризм) встречался у 63% пациентов. В большинстве случаев гепато- и спленомегалия, выявленные физикально, подтверждались результатами ультразвукового исследования. В свою очередь у лиц с гепато-холангитическим вариантом течения острого описторхоза преобладали симптомы, обусловленные поражением гепато-биллиарной системы (у 92%): боли в области подреберья справа, желтуха различной степени выраженности, значительное увеличение печени (выступает на 4 см и более из под края реберной дуги). Симптомы Ортнера, Кера, Мюсси – положительные. Астеновегетативный синдром выявлялся у 32% пациентов.

Гастроэнтероколитический вариант острой фазы описторхоза характеризовался жалобами на частый жидкий стул (79%), болями в животе (84%), метеоризмом (54%); тошнота и рвота были отмечены у 47%.

Вторую группу обследованных составили 32 больных хроническим описторхозом с выраженной клинической картиной (реинвазия, суперинвазия) (рубрика В-66 – описторхоз по МКБ-10). Верификацию диагноза проводили на основании данных клинико-эпидемиологического, инструментального и лабораторного исследований. Анамнестически у всех

пациентов данной категории был определен примерный срок инвазии, оценивались жалобы, характер течения заболевания и объективные признаки. Проводился широкий спектр лабораторных исследований, включавший общий и биохимический анализ крови, иммуноферментный анализ, оценку иммунного статуса, дуоденальное зондирование и копроовоскопию.

У обследованных нами пациентов с хроническим описторхозом в 95% случаев заболевание было выявлено впервые, у 5% больных - в анамнезе курс дегельминтизации бильтрицидом.

В соответствии с классификацией, предложенной Н.Н. Озерецковской [2000], были выделены следующие клинические группы: 1) больные с гепатохолангитическим вариантом течения хронического описторхоза - 18 пациентов; 2) больные холангиохолециститом - 10 человек; 3) больные гепатопанкреатитом - 4 человека.

Клиника хронического описторхоза была полиморфной, отличалась большим разнообразием и не укладывалась в какой-либо один синдром. Анализ клинической картины у больных хроническим описторхозом показал, что наиболее часто выявлялись синдромы гастро-дуоденальной диспепсии (тошнота, чувство давления в эпигастральной области, изжога, отрыжка, снижение или полное отсутствие аппетита) – у 94%, ангиохолецистита – у 68%, панкреатический – у 36%. Кроме того, у 30% больных на коже периодически появлялись высыпания; у 12% возникали приступы удушья по типу бронхиальной астмы; синдром холестаза (желтушное окрашивание кожи и склер, зуд, билирубинемия) обнаруживался у 16%; артралгический синдром регистрировался у 9% больных.

Группу сравнения составили 20 пациентов с хроническим описторхозом без эозинофилии крови с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

## 2.2. Методы исследования

У пациентов с заболеваниями, сопровождающимися выраженной эозинофилией крови, и у здоровых доноров проводили исследование особенностей реализации программированной гибели эозинофилов *in vitro* в интактной культуре и в условиях инкубации с рекомбинантными формами цитокинов (IL-5, IL-3, eotaxin); исследование концентрации ключевых цитокинов, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофилов, в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов (IL-5, IL-3) и сыворотке крови (eotaxin).

Распределение здоровых доноров и обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице 3.

### 2.2.1. Определение содержания общего количества лейкоцитов, эозинофилов и лимфоцитов в крови

Общее количество лейкоцитов, относительное содержание эозинофилов и лимфоцитов подсчитывали в мазках крови, приготовленных стандартным гематологическим методом [Меньшиков В.В., 1987]. Абсолютное количество эозинофилов рассчитывали из общего содержания лейкоцитов, которое определяли пробирочным способом [Меньшиков В.В., 1987].

### 2.2.2. Выделение эозинофилов крови

Принцип метода заключается в оседании эозинофилов в соответствии с их плотностью в определенном градиенте. Использовали пятиступенчатый градиент Percoll («Amersham Biosciences AB», Швеция) 1,070, 1,081, 1,090, 1,095, 1,105 [Gartner I., 1980].

Приготовление градиента различной плотности проводили по формуле:

$$X = V \times P - 0,106 - 0,9 / P_0 - 0,13,$$

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).

Таблица 3

Распределение здоровых доноров и пациентов с заболеваниями, ассоциированными с эозинофилией крови, в соответствии с использованными методами исследования

№ п/п	Методы исследования	Группы обследованных		
		Здоровые доноры	Пациенты со злокачественными заболеваниями системы крови	Пациенты с описторхозом
1.	Определение показателей лейкоцитарного звена крови (общего количества лейкоцитов, абсолютного и относительного содержания эозинофилов)	25	89	82
2.	Оценка реализации апоптоза в аннексиновом тесте методом лазерной проточной цитометрии			
	1. - цитофлуориметрическая оценка спонтанного апоптоза эозинофилов крови	10	15	15
	2. Модуляция апоптоза in vitro: - лишением ростовых факторов - добавлением рекомбинантных форм цитокинов (IL-5, IL-3, eotaxin)	10 10	15 15	15 15
3.	Исследование содержания (IL-3, IL-5) цитокинов, регулирующих гомеостаз эозинофилов, в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и уровня eotaxin в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	20	60	45

Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) в количестве 10-20 мл осаждали раствором декстрана (в 0,9% NaCl) в соотношении 1:4 с целью удаления эритроцитов. Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 45-60 мин. Надосадок удаляли и центрифугировали при 1500 об/мин 3 мин. Полученный супернатант в объеме 1 мл наслаивали на градиент плотности Percoll и центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 мин. Полученные эозинофильные кольца собирали пастеровской

пипеткой с раздела фаз и дважды отмывали раствором Хенкса (или 0,9% NaCl), последовательно ресуспендируя и центрифугируя в течение 10 мин при 1500 об/мин. Из осадка клеток, полученного с каждого градиента Percoll, готовили мазки и окрашивали азурII-эозином с последующим подсчетом 100 клеток и определением относительного содержания эозинофилов. Подсчет количества эозинофилов проводили общепринятыми гематологическими методами [Меньшиков В.В., 1987].

### **2.2.3. Культивирование эозинофилов крови**

Выделенные эозинофилы крови ( $2 \cdot 10^5$  в лунке) культивировали в 96-луночных иммунологических планшетах в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 2мМ/мл HEPES («Flow», GB), в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2.4. Оценка апоптотической реакции эозинофилов крови методом проточной лазерной цитометрии**

#### **2.2.4.1. Регистрация апоптоза эозинофилов крови**

Регистрация апоптоза была основана на определении экспрессии на поверхности клеток фосфатидилсерина. Для его обнаружения использовался FITC-меченный аннексин V, который обладает сродством к фосфатидилсерину.

После выделения и культивирования эозинофилов описанным выше способом клетки суспензировали ( $1 \cdot 10^6$  в 1 мл) в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченный FITC, и через 15 мин подвергали проточной цитофлуориметрии.

Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) с аргоновым лазером. Оценивали следующие параметры: малое угловое светорассеяние (FSC),

характеризующее размер клетки, боковое светорассеяние (SSC), характеризующее цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, показатель зеленой флуоресценции (FITC – 530 нм) в гейте эозинофильных клеток, выявляемого на FL1-канале. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала).

#### **2.2.4.2. Оценка апоптоза эозинофилов крови при лишении ростовых факторов**

В ряде случаев программа апоптоза реализуется при лишении клеток необходимых для них факторов выживания. Эффект ростовых факторов обусловлен их действием на специфические рецепторы, что приводит к синтезу подавляющих апоптоз агентов и ингибированию стимуляторов апоптоза. Уровень экспрессии данных рецепторов, то есть функциональное состояние клеток, зачастую определяет их реакцию на воздействие внешних стимулов или отсутствие таковых [Самуилов В.И., 2000].

Выделенные эозинофилы крови культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах. В лунки вносили суспензию клеток ( $1 \cdot 10^5$  на лунку), а также чистую среду RPMI-1640 без эмбриональной телячьей сыворотки, то есть в отсутствии ростовых факторов. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Регистрацию апоптоза осуществляли в аннексиновом тесте с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии как описано выше (п. 2.2.4.1.).

#### **2.2.4.3. Оценка влияния рекомбинантных форм цитокинов (IL-5, IL-3 и eotaxin) на апоптотическую гибель эозинофильных гранулоцитов**

После выделения и культивирования эозинофилов описанным выше способом в отдельные пробы добавляли  $10^{-8}$  г/мл рекомбинантного (r) IL-3 (r-IL-3) («Biosource», Бельгия),  $10^{-8}$  г/мл r-IL-5 («Biosource», Бельгия),  $10^{-8}$  г/мл r-eotaxin («Biosource», Бельгия). После отмывки фосфатно-солевым буфером



(pH=7,4) клетки ( $10^6$  в 1 мл) окрашивали в буфере («Caltag», США), содержащем аннексин V - FITC.

Регистрацию апоптоза осуществляли в аннексиновом тесте с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии (п. 2.2.4.1.).

### **2.2.5. Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови**

Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови основано на разделении популяций клеток крови в градиенте плотности. В качестве градиента плотности использовали Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция). Венозную гепаринизированную кровь (25 ЕД/мл) выдерживали при 37<sup>0</sup>С в течение 40-60 мин для отделения плазмы и эритроцитов. Полученную плазму наслаивали на градиент (1,077 г/см<sup>3</sup>) в соотношении 1:1 и центрифугировали при 1500 об/мин 20 мин. Образовавшееся кольцо из смеси мононуклеарных клеток собирали пастеровской пипеткой с раздела фаз. Трижды отмывали средой RPMI-1640, последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 об/мин [Тотолян А.А. и соавт., 2002].

### **2.2.6. Культивирование мононуклеарных лейкоцитов**

Для получения супернатантов выделенные мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина. Стандартизировали количество клеток в суспензии до концентрации  $2,0 \times 10^6$ /мл. Для стимуляции секреторной способности мононуклеаров в пробы вносили 10 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) («Difco», Германия). Клеточные суспензии в количестве 1,5 мл инкубировали при 37<sup>0</sup>С и 5% CO<sub>2</sub> на протяжении 18 ч. После инкубации пробирки встряхивали, центрифугировали 10 мин при 1500 об/мин, супернатанты собирали и использовали для количественного определения уровней цитокинов [Хаитов Р.М. и соавт., 1995].

### **2.2.7. Определение содержания эозинофилтропных цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и eotaxin в сыворотке крови**

Для определения уровней IL-3 и IL-5 в супернатантах интактной и ФГА-стимулированной культур мононуклеарных лейкоцитов и eotaxin в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA). Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Biosource», Бельгия).

Для исследования содержания IL-3 и IL-5 в соответствующие ячейки планшета добавляли по 100 мкл «0 дозы» и стандартов с известными концентрациями для IL-3 и IL-5. В оставшиеся ячейки помещали по 100 мкл супернатанта и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. После четырехкратного цикла промывки в лунки микропланшета добавляли по 100 мкл раствора биотинилированных антител и вновь проводили инкубацию при комнатной температуре в течение 1 ч (для определения IL-3) или 30 мин (для определения IL-5). После четырех циклов промывки в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидин-пероксидазы и оставляли на 30 мин при комнатной температуре. По окончании инкубации проводили четырехкратную промывку микропланшетов и в каждую ячейку добавляли по 100 мкл раствора хромогена. Через 30 мин инкубации в затемненном месте при температуре 20-25<sup>0</sup>С в лунки вносили по 100 мкл стоп-реагента (0,5М серная кислота).

Для оценки уровня eotaxin микропипеткой добавляли по 50 мкл «0 дозы» и стандартов с известной концентрацией для eotaxin в соответствующие ячейки микропланшета, предварительно внося во все лунки по 50 мкл буфера для инкубации. В остальные лунки помещали сыворотку в объеме 50 мкл и раствор биотинилированных антител по 100 мкл. Проводили инкубацию при комнатной температуре в течение 2 ч.

После четырех циклов промывки в каждую ячейку добавляли по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидин-пероксидазы и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После четырехкратного цикла промывки в лунки микропланшета вносили по 100 мкл раствора хромогена и инкубировали в темном месте при комнатной температуре 30 мин. По окончании завершающей фазы инкубации в ячейки вносили по 100 мкл стоп-раствора.

Учет результатов иммуноферментного анализа производили с использованием фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой и выражали в пг/мл.

### **2.2.8. Статистический анализ результатов исследования**

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Shapiro-Wilk's). Для нормально распределенных выборок вычисляли средневыборочные характеристики: среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ), среднее квадратичное отклонение ( $\sigma$ ), ошибка среднего ( $m$ ). Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану ( $M$ ), первый и третий квартили ( $Q_1$ ,  $Q_3$ ).

При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся критерию нормального распределения, использовали критерий Kruskal-Wallis. С целью попарного сравнения показателей в исследуемых группах применяли критерий Mann-Whitney для независимых групп. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости  $p < 0,05$ .

С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой

корреляции Спирмена ( $r$ ). Методом множественной регрессии были рассчитаны коэффициенты  $\beta$ , определяющие степень зависимости между исследованными показателями [Гланц С., 1998; Боровиков В.П., 2001].

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1. Количественные показатели лейкоцитарного звена крови у пациентов с заболеваниями, ассоциированными с эозинофилией крови

При изучении количественных показателей лейкоцитарного звена крови было установлено, что у здоровых доноров общее количество лейкоцитов составляло  $(4,85 \pm 0,75) \cdot 10^9/\text{л}$ , абсолютное содержание эозинофилов -  $(0,10 \pm 0,01) \cdot 10^9/\text{л}$ , а относительное было равным  $2,18 \pm 0,06\%$  (табл. 4).

Таблица 4

Общее количество лейкоцитов и содержание эозинофилов в крови у пациентов с гемобластозами ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Регистрируемые параметры			
		Общее количество лейкоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$	Содержание эозинофилов		
			%	$\cdot 10^9/\text{л}$	
Здоровые доноры	1	$4,85 \pm 0,75$	$2,18 \pm 0,06$	$0,10 \pm 0,01$	
Пациенты с гемобластозами без эозинофилии	2	$5,40 \pm 0,23$	$3,09 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,01$	
Пациенты с гемобластозами с эозинофилией	лимфогранулематоз	3	$7,15 \pm 1,17$	$25,79 \pm 4,29$	$1,95 \pm 0,01$
	множественная миелома	4	$4,50 \pm 0,07$	$16,86 \pm 2,63$	$0,74 \pm 0,01$
	лимфомы неходжкинские	5	$4,65 \pm 0,09$	$15,18 \pm 2,66$	$0,69 \pm 0,02$
Р-межгрупповая		0,041	0,031	0,001	
Р-парные		$P_{1-2}=0,062$ $P_{1-3}=0,031$ $P_{1-4}=0,055$ $P_{1-5}=0,134$ $P_{2-3}=0,051$ $P_{2-4}=0,090$ $P_{2-5}=0,078$ $P_{3-4}=0,034$ $P_{3-5}=0,049$ $P_{4-5}=0,070$	$P_{1-2}=0,075$ $P_{1-3}=0,003$ $P_{1-4}=0,014$ $P_{1-5}=0,042$ $P_{2-3}=0,012$ $P_{2-4}=0,041$ $P_{2-5}=0,031$ $P_{3-4}=0,045$ $P_{3-5}=0,038$ $P_{4-5}=0,099$	$P_{1-2}=0,074$ $P_{1-3}=0,002$ $P_{1-4}=0,035$ $P_{1-5}=0,030$ $P_{2-3}=0,009$ $P_{2-4}=0,029$ $P_{2-5}=0,045$ $P_{3-4}=0,049$ $P_{3-5}=0,037$ $P_{4-5}=0,071$	

У пациентов с гемобластозами без эозинофилии общее количество лейкоцитов, а также абсолютное и относительное содержание эозинофилов в

крови достоверно не отличалось от соответствующих показателей контроля ( $p=0,062$ ,  $p=0,074$  и  $p=0,075$ , соответственно) (табл. 4).

У лиц, страдающих злокачественными новообразованиями системы крови, сопровождающимися эозинофилией, достоверное повышение (в 1,47 раза) общего количества лейкоцитов отличалось лишь у лиц с лимфогранулематозом ( $p=0,031$ ); у пациентов с множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами значение данного показателя соответствовало таковому в контрольной группе ( $p=0,055$  и  $p=0,134$ , соответственно). У всех обследованных нами больных с гемобластозами было выявлено достоверное увеличение абсолютного и относительного содержания эозинофилов по сравнению со значениями у здоровых доноров и у больных группы сравнения (без эозинофилии). Так, у больных лимфогранулематозом абсолютное и относительное количество эозинофилов составляло соответственно  $(1,95 \pm 0,01) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p=0,002$  и  $p=0,009$ ) и  $25,79 \pm 4,29\%$  ( $p=0,003$  и  $p=0,012$ ), при множественной миеломе  $(0,74 \pm 0,01) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p=0,035$  и  $p=0,029$ ) и  $16,86 \pm 2,63\%$  ( $p=0,014$  и  $p=0,041$ ), при неходжкинских лимфомах  $(0,69 \pm 0,02) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p=0,030$  и  $p=0,045$ ) и  $15,18 \pm 2,66\%$  ( $p=0,042$  и  $p=0,031$ ) (табл. 4).

Сравнительный анализ полученных данных показал, что абсолютное и относительное содержание эозинофилов в крови в большей степени было увеличено у пациентов с лимфогранулематозом (табл. 4).

У больных хроническим описторхозом без эозинофилии общее количество лейкоцитов достоверно превышало (в среднем 1,6 раза) аналогичные показатели нормы ( $p=0,031$ ) (табл. 5). Относительное и абсолютное содержание эозинофилов крови у данной категории пациентов достоверно не отличались от таковых в группе контроля ( $p=0,063$  и  $p=0,092$ , соответственно) (табл. 5).

У пациентов как с острым, так и с хроническим описторхозом было выявлено достоверное увеличение (по сравнению с контрольной группой) общего количества лейкоцитов (соответственно в 2,4 и 1,8 раз,  $p=0,007$  и  $p=0,034$ ) (табл. 5).

Общее количество лейкоцитов и содержание эозинофилов в крови у пациентов с описторхозом ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Регистрируемые параметры			
			Общее количество лейкоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$	Содержание эозинофилов	
				%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	4,85±0,75	2,18±0,06	0,10±0,01	
Пациенты с хроническим описторхозом без эозинофилии	2	7,98±1,04	3,11±0,03	0,19±0,01	
Пациенты с описторхозом с эозинофилией	острый	3	11,40±1,19	45,43±8,71	4,53±0,01
	хронический	4	8,91±1,06	19,51±1,76	1,73±0,03
Р-межгрупповая		0,047	<0,001	<0,001	
Р-парные		$P_{1-2}=0,031$ $P_{1-3}=0,007$ $P_{1-4}=0,034$ $P_{2-3}=0,064$ $P_{2-4}=0,091$ $P_{3-4}=0,073$	$P_{1-2}=0,063$ $P_{1-3}=0,001$ $P_{1-4}=0,019$ $P_{2-3}=0,001$ $P_{2-4}=0,011$ $P_{3-4}=0,020$	$P_{1-2}=0,092$ $P_{1-3}<0,001$ $P_{1-4}=0,001$ $P_{2-3}<0,001$ $P_{2-4}=0,002$ $P_{3-4}=0,001$	

Примечательно, что у всех обследованных лиц с острым описторхозом регистрировалось повышение относительного и абсолютного содержания эозинофилов в крови, превосходя норму соответственно в 20,8 и 45,3 раз ( $p=0,001$  и  $p<0,001$ ) (табл. 5). При этом у 50% обследованных с острым описторхозом содержание эозинофилов в гемограмме составляло от 15 до 50%; у 45% пациентов – свыше 50%, лишь у 5% больных - доля эозинофильных клеток не превышала 15%.

У больных хроническим описторхозом, сопровождающимся эозинофилией, регистрировалось достоверное увеличение (по сравнению со здоровыми донорами) относительного и абсолютного содержания эозинофилов в крови в 8,9 и 17,3 раза ( $p=0,019$  и  $p=0,001$ , соответственно) (табл. 5). Следует отметить, что у обследованных нами лиц, страдающих

хроническим описторхозом, ассоциированным эозинофилией, число эозинофильных лейкоцитов в гемограмме до 15% было отмечено у 70% пациентов; от 15 до 50% - у 30% пациентов.

### **3.2. Особенности реализации апоптоза эозинофилов у больных с эозинофилиями**

Изучение реализации программированной гибели эозинофильных лейкоцитов, полученных у пациентов с эозинофилией крови, проводили с помощью аннексинового теста с использованием метода лазерной проточной цитометрии в условиях полной питательной среды.

В интактной культуре эозинофилов, полученных у здоровых доноров, относительное и абсолютное содержание апоптотически измененных клеток регистрировалось на уровнях  $14,94 \pm 1,09\%$  и  $(0,019 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$ , соответственно (табл. 6).

Исследование реализации апоптотической гибели эозинофилов крови, полученных у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови, сопровождавшимися эозинофилией, позволило выявить статистически значимое увеличение абсолютного числа клеток в апоптозе по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц (в 9,4 раза при лимфогранулематозе, в 3,1 раза при неходжкинских лимфомах ( $p=0,001$  и  $p=0,028$ , соответственно)) (табл. 6). У пациентов с множественной миеломой абсолютное количество апоптотически измененных эозинофильных лейкоцитов достоверно не отличалось от нормы ( $p=0,190$ ) (табл.6).

У всех групп обследованных больных гемобластозами относительное содержание эозинофилов, экспрессирующих на мембране фосфатидилсерин, было значимо ниже аналогичных показателей контроля и составляло:  $4,61 \pm 0,86\%$  - при злокачественной гранулеме,  $3,35 \pm 0,07\%$  - при множественной миеломе,  $4,34 \pm 0,67\%$  - при неходжкинских лимфомах ( $p=0,015$ ,  $p=0,034$  и  $p=0,020$ , соответственно) (табл. 6).



Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с гемобластозами, ассоциированными с эозинофилией ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия культивирования <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Бессывороточная среда инкубации	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94±1,09	0,019±0,001	26,81±2,68 p* < 0,05	0,033±0,002 p* < 0,05
Пациенты с лимфогранулематозом	2	4,61±0,86	0,178 ±0,011	52,22±3,08 p* < 0,05	0,657±0,014 p* < 0,05
Пациенты с множественной миеломой	3	3,35±0,07	0,023±0,001	43,89±1,28 p* < 0,05	0,235±0,022 p* < 0,05
Пациенты с лимфомами неходжкинскими	4	4,34±0,67	0,059±0,002	55,09±4,06 p* < 0,05	0,284±0,007 p* < 0,05
Р-межгрупповая		0,017	0,021	0,049	0,026
Р-парные		P <sub>1-2</sub> =0,015 P <sub>1-3</sub> =0,034 P <sub>1-4</sub> =0,020 P <sub>2-3</sub> =0,099 P <sub>2-4</sub> =0,166 P <sub>3-4</sub> =0,067	P <sub>1-2</sub> =0,001 P <sub>1-3</sub> =0,190 P <sub>1-4</sub> =0,028 P <sub>2-3</sub> =0,011 P <sub>2-4</sub> =0,005 P <sub>3-4</sub> =0,045	P <sub>1-2</sub> =0,009 P <sub>1-3</sub> =0,015 P <sub>1-4</sub> =0,021 P <sub>2-3</sub> =0,061 P <sub>2-4</sub> =0,079 P <sub>3-4</sub> =0,125	P <sub>1-2</sub> <0,001 P <sub>1-3</sub> =0,034 P <sub>1-4</sub> =0,003 P <sub>2-3</sub> =0,031 P <sub>2-4</sub> =0,019 P <sub>3-4</sub> =0,049

Примечание:

Здесь и в табл. 7, 10, 11, 14, 15, 18, 19 p\*- достоверность различий по сравнению с показателями в интактной культуре эозинофилов у лиц данной клинической группы.

Исследование содержания апоптотических эозинофилов крови у пациентов с острым описторхозом в условиях культивирования клеток в полной питательной среде (интактная культура) позволило установить достоверное снижение по сравнению со здоровыми донорами (в 2,1 раза) относительного числа аннексин-позитивных клеток (p=0,025) (табл. 7).

Абсолютное количество эозинофилов в апоптозе было значимо выше (в 20,4 раза и 11,6 раза по сравнению с контролем) как у больных острым, так и хроническим описторхозом (p<0,001 и p=0,008, соответственно) (табл.7). В то же время у лиц с хроническим описторхозом относительное содержание

эозинофильных гранулоцитов, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы, достоверно не отличалось от аналогичного параметра у здоровых доноров ( $p=0,054$ ) (табл. 7).

Таблица 7

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия культивирования <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Бессывороточная среда инкубации	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94 $\pm$ 1,09	0,019 $\pm$ 0,001	26,81 $\pm$ 2,68 $p^* < 0,05$	0,033 $\pm$ 0,002 $p^* < 0,05$
Пациенты с острым описторхозом	2	7,21 $\pm$ 0,92	0,388 $\pm$ 0,012	39,03 $\pm$ 3,82 $p^* < 0,05$	2,091 $\pm$ 0,023 $p^* < 0,001$
Пациенты с хроническим описторхозом	3	9,93 $\pm$ 0,96	0,221 $\pm$ 0,009	42,01 $\pm$ 1,37 $p^* < 0,05$	0,745 $\pm$ 0,011 $p^* < 0,01$
P-межгрупповая		0,038	0,002	0,056	<0,001
P-парные		P <sub>1-2</sub> =0,025 P <sub>1-3</sub> =0,054 P <sub>2-3</sub> =0,067	P <sub>1-2</sub> <0,001 P <sub>1-3</sub> =0,008 P <sub>2-3</sub> =0,041	P <sub>1-2</sub> =0,029 P <sub>1-3</sub> =0,041 P <sub>2-3</sub> =0,090	P <sub>1-2</sub> <0,001 P <sub>1-3</sub> <0,001 P <sub>2-3</sub> =0,001

Таким образом, у пациентов с заболеваниями, сопровождавшимися выраженной эозинофилией крови, было выявлено снижение относительного числа апоптотически измененных эозинофилов.

### 3.3. Особенности реализации цитокинопосредованного апоптоза эозинофилов у пациентов с заболеваниями, ассоциированными с эозинофилией крови

Реализацию апоптотической гибели эозинофильных лейкоцитов оценивали методом проточной цитометрии с помощью аннексинового теста в условиях их инкубации *in vitro* в бессывороточной среде и с добавлением рекомбинантных форм цитокинов IL-3, IL-5 и eotaxin (r-IL-3, r-IL-5, r-eotaxin).

### 3.3.1. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях инкубации *in vitro* с r-IL-5

IL-5 – цитокин, регулирующий образование и созревание эозинофильных лейкоцитов в костном мозге. Наряду с этим этот цитокин является одним из ключевых медиаторов, способствующих активации и миграции эозинофилов в ткань. Известно также, что IL-5 увеличивает время жизни этих клеток, блокируя реализацию их апоптотической гибели. Основными клетками-продуцентами данного цитокина являются Th2-лимфоциты, а также сами эозинофилы. В связи с этим для нас представляло интерес исследование продукции IL-5 мононуклеарами крови и его влияния на регуляцию апоптоза эозинофильных лейкоцитов.

Как показали результаты исследования, направленного на выявление способности мононуклеаров крови продуцировать эозинофилспецифичный цитокин, уровень базальной продукции IL-5 у здоровых лиц составил 96,5(89,0-105,0) пг/мл, а ФГА-стимулированной 164,0(158,0-190,0) пг/мл. Индекс стимуляции оказался равным 2,03(1,88-2,36) усл. ед. (табл. 8).

Изучение цитокинпродуцирующей способности мононуклеарных лейкоцитов крови у лиц с гемобластозами без эозинофилии показало, что конституциональная и ФГА-инициированная продукция IL-5 составили 113,2(78,2-145,9) пг/мл ( $p=0,053$ ) и 145,1(110,0-167,2) пг/мл ( $p=0,070$ ), соответственно, не имея достоверной разницы с аналогичными показателями у здоровых доноров (табл. 8).

В свою очередь, у больных лимфопролиферативными заболеваниями, ассоциированными с эозинофильной реакцией крови, отмечалось достоверное увеличение (по сравнению с нормой) продукции мононуклеарами IL-5. Так, при лимфоме Ходжкина уровень базальной продукции IL-5 превышал аналогичный показатель в контроле в среднем в 2,8 раза ( $p=0,041$ ), а ФГА-индуцибельной - в 3,15 раза ( $p=0,041$ ); при множественной миеломе - в 4,08 и 1,71 раза, соответственно ( $p=0,035$  и  $p=0,045$ ); при неходжкинских

лимфомах - в 2,03 и 1,78 раза, соответственно ( $p=0,001$  и  $p=0,014$ ) по сравнению со здоровыми донорами (табл.8).

Таблица 8

Содержание IL-5 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с гемобластозами, ассоциированными с эозинофилией (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Характеристика обследованных		Продукция IL-5			
		Интактная культура, пг/мл	ФГА-стимулированная культура, пг/мл	Индекс стимуляции, усл. ед.	
Здоровые доноры	1	96,5 (89,0-105,0)	164,0 (158,0-190,0)	2,03 (1,88-2,36)	
Пациенты с гемобластозами без эозинофилии	2	113,2 (78,2-145,9)	145,1 (110,0-167,2)	1,32 (1,21-1,49)	
Пациенты с гемобластозами с эозинофилией	лимфогранулематоз	3	270,5 (192,0-315,1)	517,0 (212,5-651,5)	1,43 (1,36-1,52)
	множественная миелома	4	394,0 (269,0-692,0)	280,0 (110,0-394,0)	0,88 (0,73-0,95)
	лимфомы неходжкинские	5	195,5 (161,0-269,0)	292,5 (280,0-394,0)	1,08 (0,96-1,28)
P-межгрупповая		0,001	0,001	0,019	
P-парные		P <sub>1-2</sub> =0,053 P <sub>1-3</sub> =0,041 P <sub>1-4</sub> =0,035 P <sub>1-5</sub> =0,001 P <sub>2-3</sub> =0,001 P <sub>2-4</sub> =0,034 P <sub>2-5</sub> =0,009 P <sub>3-4</sub> =0,015 P <sub>3-5</sub> =0,070 P <sub>4-5</sub> =0,026	P <sub>1-2</sub> =0,070 P <sub>1-3</sub> =0,041 P <sub>1-4</sub> =0,045 P <sub>1-5</sub> =0,014 P <sub>2-3</sub> =0,033 P <sub>2-4</sub> =0,021 P <sub>2-5</sub> =0,014 P <sub>3-4</sub> =0,023 P <sub>3-5</sub> =0,034 P <sub>4-5</sub> =0,067	P <sub>1-2</sub> =0,010 P <sub>1-3</sub> =0,028 P <sub>1-4</sub> =0,001 P <sub>1-5</sub> =0,001 P <sub>2-3</sub> =0,051 P <sub>2-4</sub> =0,021 P <sub>2-5</sub> =0,056 P <sub>3-4</sub> =0,045 P <sub>3-5</sub> =0,064 P <sub>4-5</sub> =0,057	

Исследование содержания IL-5 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с хроническим описторхозом, не сопровождавшимся эозинофилией, как в интактной, так и в ФГА-стимулированной пробах показало отсутствие статистически значимых различий по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых доноров ( $p=0,141$  и  $p=0,058$ , соответственно) (табл. 9).

Таблица 9

Содержание IL-5 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией (Ме (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Характеристика обследованных		Продукция IL-5			
		Интактная культура, пг/мл	ФГА-стимулированная культура, пг/мл	Индекс стимуляции, усл. ед.	
Здоровые доноры	1	96,5 (89,0-105,0)	164,0 (158,0-190,0)	2,03 (1,88-2,36)	
Пациенты с хроническим описторхозом без эозинофилии	2	105,2 (89,0-117,4)	155,3 (141,0-168,0)	1,49 (1,33-1,58)	
Пациенты с описторхозом с эозинофилией	острый	3	183,0 (160,0-204,2)	318,3 (217,7-465,0)	1,63 (1,36-1,72)
	хронический	4	168,0 (151,2-199,0)	227,0 (208,1-347,2)	1,35 (1,13-1,45)
P-межгрупповая		<0,001	0,001	0,019	
P-парные		P <sub>1-2</sub> =0,141 P <sub>1-3</sub> =0,001 P <sub>1-4</sub> =0,027 P <sub>2-3</sub> =0,021 P <sub>2-4</sub> =0,002 P <sub>3-4</sub> =0,705	P <sub>1-2</sub> =0,058 P <sub>1-3</sub> =0,029 P <sub>1-4</sub> =0,028 P <sub>2-3</sub> =0,005 P <sub>2-4</sub> =0,014 P <sub>3-4</sub> =0,049	P <sub>1-2</sub> =0,021 P <sub>1-3</sub> =0,023 P <sub>1-4</sub> =0,012 P <sub>2-3</sub> =0,111 P <sub>2-4</sub> =0,105 P <sub>3-4</sub> =0,914	

При гельминтозе, вызванном *O.felineus*, ассоциированном с эозинофилией крови, регистрировалось статистически значимое повышение цитокин-продуцирующей способности мононуклеаров крови по сравнению с таковой у больных без эозинофилии и здоровых индивидуумов. Так, при остром описторхозе показатель базальной продукции IL-5 превышал (в среднем на 87%) норму, а ФГА-инициированной на 94% (p=0,001 и p=0,029, соответственно) (табл. 9).

Наряду с этим конституциональная продукция вышеуказанного цитокина у пациентов с хроническим описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, превосходила в среднем на 60% таковую у больных группы сравнения (без эозинофилии) и на 71% - у здоровых доноров (p=0,002 и

$p=0,027$ , соответственно), а ФГА-индуцибельная - в среднем на 46 и 38% ( $p=0,014$  и  $p=0,028$ ) соответственно (табл. 9).

Исследование реализации апоптотической программы эозинофилов, полученных у здоровых доноров, в условиях инкубации *in vitro* с r-IL-5 позволило зарегистрировать статистически значимое снижение относительного и абсолютного числа эозинофильных клеток в апоптозе по сравнению с его интактным уровнем - в 2,1 и 2,7 раза ( $p<0,01$  и  $p<0,05$ , соответственно) (табл. 10).

Таблица 10

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с гемобластозами, ассоциированными с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с рекомбинантной формой цитокина IL-5 (r-IL-5) ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия инкубации <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Инкубация с r-IL-5	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94 $\pm$ 1,09	0,019 $\pm$ 0,001	7,16 $\pm$ 1,23 $p^*<0,01$	0,007 $\pm$ 0,000 $p^*<0,05$
Пациенты с лимфогранулематозом	2	4,61 $\pm$ 0,86	0,178 $\pm$ 0,011	3,25 $\pm$ 0,35 $p^*>0,05$	0,110 $\pm$ 0,002 $p^*<0,01$
Пациенты с множественной миеломой	3	3,35 $\pm$ 0,07	0,021 $\pm$ 0,001	3,14 $\pm$ 0,38 $p^*>0,05$	0,035 $\pm$ 0,001 $p^*>0,05$
Пациенты с лимфомами неходжкинскими	4	4,34 $\pm$ 0,67	0,059 $\pm$ 0,002	3,38 $\pm$ 0,08 $p^*>0,05$	0,070 $\pm$ 0,001 $p^*>0,05$
Р-межгрупповая		0,017	0,021	0,035	0,030
Р-парные		P <sub>1-2</sub> =0,015 P <sub>1-3</sub> =0,034 P <sub>1-4</sub> =0,020 P <sub>2-3</sub> =0,099 P <sub>2-4</sub> =0,166 P <sub>3-4</sub> =0,067	P <sub>1-2</sub> =0,001 P <sub>1-3</sub> =0,190 P <sub>1-4</sub> =0,028 P <sub>2-3</sub> =0,011 P <sub>2-4</sub> =0,005 P <sub>3-4</sub> =0,045	P <sub>1-2</sub> =0,019 P <sub>1-3</sub> =0,015 P <sub>1-4</sub> =0,021 P <sub>2-3</sub> =0,064 P <sub>2-4</sub> =0,091 P <sub>3-4</sub> =0,083	P <sub>1-2</sub> =0,001 P <sub>1-3</sub> =0,038 P <sub>1-4</sub> =0,004 P <sub>2-3</sub> =0,009 P <sub>2-4</sub> =0,042 P <sub>3-4</sub> =0,048

При инкубации *in vitro* эозинофильных лейкоцитов, полученных у больных гемобластозами, сопровождавшимися эозинофилией крови, с r-IL-5 фиксировалось снижение относительного и абсолютного содержания

апоптотических клеток по сравнению с аналогичными показателями контроля: до  $3,25 \pm 0,35\%$  и  $(0,110 \pm 0,002) \cdot 10^9/\text{л}$  - при лимфогранулематозе ( $p=0,019$  и  $p=0,001$ , соответственно), до  $3,14 \pm 0,38\%$  и  $(0,035 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$  - при множественной миеломе ( $p=0,015$  и  $p=0,038$ , соответственно) и до  $3,38 \pm 0,08\%$  и  $(0,070 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$  - при неходжкинских лимфомах ( $p=0,021$  и  $p=0,004$ , соответственно) (табл. 10). Следует отметить, что значения изученных показателей не отличались от таковых в интактных культурах ( $p>0,05$ ) (табл. 10). В то же время у лиц с болезнью Ходжкина выявлялось снижение абсолютного числа эозинофилов в апоптозе на 38% по сравнению с аналогичными параметрами спонтанного апоптоза ( $p<0,01$ ) (табл. 10).

При инкубации эозинофильных лейкоцитов, полученных у больных описторхозом, в среде с r-IL-5 регистрировалось достоверное снижение (по сравнению со здоровыми донорами) относительного числа клеток в апоптозе (в 2 раза при остром и в 1,8 раза при хроническом описторхозе ( $p=0,013$  и  $p=0,022$ , соответственно)). Наряду с этим отмечалось статистически значимое уменьшение относительного и абсолютного числа апоптотически измененных эозинофилов по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза в 2,0 и 1,4 раза у больных острым описторхозом ( $p<0,05$  и  $p<0,05$ , соответственно) и в 2,5 и 2,3 раза при хроническом описторхозе ( $p<0,01$  и  $p<0,01$ , соответственно) (табл. 11).

Таким образом, у всех обследованных лиц с выраженной эозинофилией крови выявлялась повышенная продукция IL-5 мононуклеарными клетками. Инкубация эозинофильных лейкоцитов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, с r-IL-5 позволила выявить отсутствие чувствительности клеток к антиапоптотическому влиянию данного медиатора; напротив, у больных описторхозом в эксперименте отмечена повышенная чувствительность эозинофилов к апоптозингибирующему действию IL-5.

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с рекомбинантной формой цитокина IL-5(r-IL-5) ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия инкубации <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Инкубация с r-IL-5	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94±1,09	0,019±0,001	7,16±1,23 p* $<$ 0,01	0,007±0,000 p* $<$ 0,05
Пациенты с острым описторхозом	2	7,21±0,92	0,388±0,012	3,57±0,13 p* $<$ 0,05	0,274±0,015 p* $<$ 0,05
Пациенты с хроническим описторхозом	3	9,93±0,96	0,221 ±0,009	4,01±0,43 p* $<$ 0,01	0,097±0,002 p* $<$ 0,01
P-межгрупповая		0,038	0,002	0,043	$<$ 0,001
P-парные		P <sub>1-2</sub> =0,025 P <sub>1-3</sub> =0,054 P <sub>2-3</sub> =0,067	P <sub>1-2</sub> $<$ 0,001 P <sub>1-3</sub> =0,008 P <sub>2-3</sub> =0,041	P <sub>1-2</sub> =0,013 P <sub>1-3</sub> =0,022 P <sub>2-3</sub> =0,100	P <sub>1-2</sub> $<$ 0,001 P <sub>1-3</sub> =0,029 P <sub>2-3</sub> =0,011

### 3.3.2. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях инкубации *in vitro* в среде с добавлением r-IL-3

Известно, что IL-3 стимулирует пролиферацию и дифференцировку всех ростков гемопоэза. Основными источниками этого цитокина являются активированные Т-лимфоциты и тучные клетки. В отношении эозинофилов IL-3 не только обеспечивает ранние этапы созревания клеток, но и участвует в их активации, повышает выброс белков гранул. Не менее важным является свойство указанного медиатора увеличивать выживаемость эозинофильных гранулоцитов [Tai P.C. et al., 1991; Zangrilli J.G., 2002].

Полученные нами результаты свидетельствовали о существенном изменении продукции этого цитокина мононуклеарами крови и роли IL-3 в регуляции апоптоза эозинофилов в механизмах развития больших эозинофилий крови.



У здоровых доноров спонтанная и ФГА-индуцированная продукция ИЛ-3 регистрировалась на уровне 13,27 (12,08-23,04) пг/мл и 28,12 (23,77-42,31) пг/мл, соответственно. Индекс стимуляции продукции этого цитокина оказался равным 1,96 (1,68-2,30) усл. ед. (табл. 12).

Таблица 12

Содержание ИЛ-3 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с гемобластомами, ассоциированными с эозинофилией (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Характеристика обследованных		Продукция ИЛ-3			
		Интактная культура, пг/мл	ФГА-стимулированная культура, пг/мл	Индекс стимуляции, усл. ед.	
Здоровые доноры		1	13,27 (12,08-23,04)	28,12 (23,77-42,31)	1,96 (1,68-2,30)
Пациенты с гемобластомами без эозинофилии		2	10,04 (7,49-12,21)	16,67 (12,38-18,24)	1,28 (1,05-1,39)
Пациенты с гемобластомами с эозинофилией	лимфогранулематоз	3	21,91 (16,02-39,08)	40,16 (30,87-48,77)	1,37 (1,19-1,52)
	множественная миелома	4	34,25 (28,34-44,46)	32,10 (30,09-40,70)	0,66 (0,44-0,73)
	лимфомы неходжкинские	5	29,68 (9,60-33,71)	30,22 (10,14-36,40)	1,52 (1,36-1,78)
Р-межгрупповая			0,041	0,031	0,001
Р-парные			P <sub>1-2</sub> =0,060 P <sub>1-3</sub> =0,031 P <sub>1-4</sub> =0,034 P <sub>1-5</sub> =0,041 P <sub>2-3</sub> =0,021 P <sub>2-4</sub> =0,030 P <sub>2-5</sub> =0,011 P <sub>3-4</sub> =0,054 P <sub>3-5</sub> =0,059 P <sub>4-5</sub> =0,097	P <sub>1-2</sub> =0,067 P <sub>1-3</sub> =0,023 P <sub>1-4</sub> =0,054 P <sub>1-5</sub> =0,051 P <sub>2-3</sub> =0,012 P <sub>2-4</sub> =0,030 P <sub>2-5</sub> =0,031 P <sub>3-4</sub> =0,080 P <sub>3-5</sub> =0,019 P <sub>4-5</sub> =0,071	P <sub>1-2</sub> =0,034 P <sub>1-3</sub> =0,037 P <sub>1-4</sub> =0,029 P <sub>1-5</sub> =0,014 P <sub>2-3</sub> =0,052 P <sub>2-4</sub> =0,034 P <sub>2-5</sub> =0,061 P <sub>3-4</sub> =0,001 P <sub>3-5</sub> =0,066 P <sub>4-5</sub> =0,025

Изучение цитокинпродуцирующей способности мононуклеарных лейкоцитов крови у больных гемобластомами без эозинофилии показало, что конституциональная и ФГА-иницированная продукция ИЛ-3 у данной группы лиц составили 10,04 (7,49-12,21) пг/мл (p=0,060) и 16,67 (12,38-18,24)

пг/мл ( $p=0,067$ ), не имея достоверной разницы с аналогичными показателями у здоровых доноров (табл. 12).

Однако у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождавшимися гиперэозинофилией, продукция мононуклеарами ИЛ-3 была существенно повышена. Так, у больных лимфогранулематозом параметры базальной и ФГА-индуцибельной продукции ИЛ-3 составили 21,91 (16,02-39,08) пг/мл ( $p=0,031$ ,  $p=0,021$ ) и 40,16 (30,87-48,77) пг/мл ( $p=0,023$ ,  $p=0,012$ ), соответственно; при множественной миеломе 34,25 (28,34-44,46) пг/мл ( $p=0,034$ ,  $p=0,030$ ) и 32,10 (30,09-40,70) пг/мл ( $p=0,054$ ,  $p=0,030$ ) соответственно; при неходжкинских лимфомах 29,68 (9,60-33,71) пг/мл ( $p=0,041$ ,  $p=0,011$ ) и 30,22 (10,14-36,40) пг/мл ( $p=0,051$ ,  $p=0,031$ ), соответственно, значимо превышая аналогичные показатели контроля и группы сравнения без эозинофилии (табл. 12).

В свою очередь исследование содержания ИЛ-3 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с хроническим описторхозом, не сопровождавшимся эозинофилией, как в интактной, так и в ФГА-стимулированной пробах показало отсутствие статистически значимых различий по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых доноров ( $p=0,090$  и  $p=0,051$ , соответственно) (табл. 13).

Вместе с тем при остром описторхозе продукция мононуклеарами крови ИЛ-3 в базальной пробе в среднем в 2,0 раза превышала норму, а в ФГА-стимулированной - в 1,4 раза ( $p=0,033$  и  $p=0,042$ , соответственно) (табл. 13). У больных хроническим описторхозом, сопровождавшимся эозинофилией, уровень базальной и ФГА-инициированной продукции ИЛ-3 не отличался от аналогичных значений у здоровых доноров ( $p=0,199$  и  $p=0,841$ ) и у пациентов группы сравнения ( $p=0,071$  и  $p=0,060$ ) (табл. 13).

При культивировании эозинофильных лейкоцитов, полученных у здоровых лиц, в среде с добавлением  $\gamma$ -ИЛ-3, относительное и абсолютное количество клеток, подвергшихся апоптотической гибели, регистрировалось

на уровнях  $13,29 \pm 0,97\%$  и  $(0,014 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$ , не отличаясь от аналогичных показателей в интактной культуре ( $p > 0,05$  во всех случаях) (табл. 14).

Таблица 13

Содержание IL-3 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией (Me(Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Характеристика обследованных		Продукция IL-3			
		Интактная культура, пг/мл	ФГА-стимулированная культура, пг/мл	Индекс стимуляции, усл. ед.	
Здоровые доноры	1	13, 27(12,08-23,04)	28,12 (23,77-42,31)	1,96 (1,68-2,30)	
Пациенты с хроническим описторхозом без эозинофилии	2	19,20 (15,00-23,49)	34,38 (27,38-39,01)	1,68 (1,44-1,96)	
Пациенты с описторхозом с эозинофилией	острый	3	27,83 (16,03-32,11)	39,14 (36,4-49,3)	1,30 (1,25-1,46)
	хронический	4	17,15 (11,20-35,91)	34,30 (26,40-41,24)	1,56 (1,16-1,69)
P-межгрупповая		0,041	0,032	0,001	
P-парные		P <sub>1-2</sub> =0,090 P <sub>1-3</sub> =0,033 P <sub>1-4</sub> =0,199 P <sub>2-3</sub> =0,066 P <sub>2-4</sub> =0,071 P <sub>3-4</sub> =0,042	P <sub>1-2</sub> =0,051 P <sub>1-3</sub> =0,042 P <sub>1-4</sub> =0,841 P <sub>2-3</sub> =0,728 P <sub>2-4</sub> =0,060 P <sub>3-4</sub> =0,703	P <sub>1-2</sub> =0,070 P <sub>1-3</sub> =0,003 P <sub>1-4</sub> =0,045 P <sub>2-3</sub> =0,089 P <sub>2-4</sub> =0,100 P <sub>3-4</sub> =0,039	

Исследование содержания апоптотических эозинофилов крови у пациентов с гемобластозами, ассоциированными с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с r-IL-3 показало статистически достоверное снижение как относительного, так и абсолютного числа эозинофилов, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы, по сравнению с аналогичными показателями в группе здоровых доноров и составляло при лимфогранулематозе  $3,27 \pm 0,94\%$  и  $(0,085 \pm 0,002) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p=0,009$  и  $p=0,003$ , соответственно), при множественной миеломе  $7,46 \pm 1,33\%$  и  $(0,053 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p=0,036$  и  $p=0,035$ , соответственно), а при неходжкинских лимфомах -  $8,90 \pm 0,09\%$  и  $(0,094 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$  ( $p=0,049$  и

$p < 0,001$ , соответственно) (табл. 14). В то же время относительное и абсолютное число погибших клеток превосходило аналогичные показатели в интактной культуре в 2,0 и 1,6 раза у пациентов с неходжкинскими лимфомами ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно) и в 2,2 и 2,3 раза у больных множественной миеломой ( $p < 0,05$  во всех случаях) (табл. 14).

Таблица 14

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с гемобластомами, ассоциированными с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с рекомбинантной формой цитокина IL-3 (r-IL-3) ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия инкубации <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Инкубация с r-IL-3	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94±1,09	0,019±0,001	13,29±0,97 $p^* > 0,05$	0,014±0,001 $p^* > 0,05$
Пациенты с лимфогранулематозом	2	4,61±0,86	0,178 ±0,011	3,27±0,94 $p^* > 0,05$	0,085±0,002 $p^* < 0,01$
Пациенты с множественной миеломой	3	3,35±0,07	0,023±0,001	7,46±1,33 $p^* < 0,05$	0,053±0,001 $p^* < 0,05$
Пациенты с лимфомами неходжкинскими	4	4,34±0,67	0,059±0,002	8,90±0,09 $p^* < 0,05$	0,094±0,001 $p^* < 0,01$
Р-межгрупповая		0,017	0,021	0,014	0,009
Р-парные		$P_{1-2}=0,015$ $P_{1-3}=0,034$ $P_{1-4}=0,020$ $P_{2-3}=0,099$ $P_{2-4}=0,166$ $P_{3-4}=0,067$	$P_{1-2}=0,001$ $P_{1-3}=0,190$ $P_{1-4}=0,028$ $P_{2-3}=0,011$ $P_{2-4}=0,005$ $P_{3-4}=0,045$	$P_{1-2}=0,009$ $P_{1-3}=0,036$ $P_{1-4}=0,049$ $P_{2-3}=0,018$ $P_{2-4}=0,010$ $P_{3-4}=0,066$	$P_{1-2}=0,003$ $P_{1-3}=0,035$ $P_{1-4}<0,001$ $P_{2-3}=0,132$ $P_{2-4}=0,777$ $P_{3-4}=0,049$

При инкубации эозинофильных гранулоцитов, полученных у больных описторхозом, *in vitro* в среде с r-IL-3 отмечалось снижение (по сравнению с контролем) относительного числа клеток, экспрессирующих на своей мембране фосфатидилсерин: в 3,1 раза у пациентов с острым описторхозом и в 2,6 раза у лиц с хроническим описторхозом ( $p=0,019$  и  $p=0,028$ , соответственно). Нами было отмечено снижение (по сравнению с уровнем их спонтанной гибели) относительного и абсолютного количества аннексин-позитивных клеток, полученных у пациентов с острым описторхозом, и у

лиц, страдающих хроническим описторхозом (в 1,7 и 1,4; 1,9 и 2,5 раза ( $p < 0,05$  и  $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ ), соответственно) (табл. 15).

Таблица 15

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с рекомбинантной формой цитокина IL-3 (r-IL-3) ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия инкубации <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Инкубация с r-IL-3	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94±1,09	0,019±0,001	13,29±0,97 $p^* > 0,05$	0,014±0,001 $p^* > 0,05$
Пациенты с острым описторхозом	2	7,21±0,92	0,388±0,012	4,22±0,22 $p^* < 0,05$	0,270±0,011 $p^* < 0,05$
Пациенты с хроническим описторхозом	3	9,93±0,96	0,221 ±0,009	5,03±0,65 $p^* < 0,05$	0,089±0,003 $p^* < 0,01$
P-межгрупповая		0,038	0,002	0,021	0,009
P-парные		$P_{1-2}=0,025$ $P_{1-3}=0,054$ $P_{2-3}=0,067$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3}=0,008$ $P_{2-3}=0,041$	$P_{1-2}=0,019$ $P_{1-3}=0,028$ $P_{2-3}=0,055$	$P_{1-2} < 0,001$ $P_{1-3}=0,036$ $P_{2-3}=0,001$

Таким образом, у всех обследованных лиц с выраженной эозинофилией крови выявлялась повышенная продукция IL-3. Культивирование эозинофильных гранулоцитов, полученных у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, с r-IL-3 позволила констатировать отсутствие чувствительности клеток к антиапоптотическому влиянию данного цитокина, тогда как у пациентов описторхозом в эксперименте отмечена повышенная чувствительность эозинофилов к апоптозингибирующему действию IL-3.

### 3.3.3. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях их инкубации *in vitro* в среде с добавлением r-eotaxin

Eotaxin – хемокин CC-семейства, обладающий хемотаксической активностью в отношении эозинофильных лейкоцитов. Специфичность действия

этого медиатора может обуславливать один из механизмов формирования эозинофилии. Этот цитокин является хемоаттрактантом не только для эозинофилов, но и для базофилов и Th2-лимфоцитов. Свой биологический эффект eotaxin опосредует путем связывания со специфическим CCR3 рецептором. Источниками этого цитокина являются эпителиальные клетки и эозинофилы.

Проведенная нами оценка содержания eotaxin в сыворотке крови здоровых доноров позволила установить, что уровень цитокина оказался равным 58,95 (50,11-66,95) пг/мл (табл. 16).

Таблица 16

Содержание eotaxin в сыворотке крови у пациентов с гемобластозами, ассоциированными с эозинофилией (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Характеристика обследованных		Уровень eotaxin, пг/мл	Р-парные
Здоровые доноры		1	58,95 (50,11-66,95)
Пациенты с гемобластозами без эозинофилии		2	47,06 (32,55-61,29)
Пациенты с гемобластозами с эозинофилией	лимфогранулематоз	3	115,0 (63,82-140,5)
	множественная миелома	4	60,75 (56,59-68,49)
	лимфомы неходжкинские	5	48,66 (43,35-67,71)
Р-межгрупповая			0,047

У больных гемобластозами без эозинофилии уровень исследованного хемокина составил 47,06 (32,55-61,29) пг/мл ( $p=0,052$ ), не имея достоверной разницы с аналогичными показателями у здоровых доноров (табл. 16).

У больных злокачественными заболеваниями системы крови, ассоциированными с формированием гиперэозинофильной реакции крови, значимое увеличение (по сравнению с контролем и группой пациентов без эозинофилии) концентрации eotaxin в сыворотке крови регистрировалось лишь у

пациентов с лимфомой Ходжкина (в среднем в 1,9 и 2,4 раза,  $p=0,019$  и  $p=0,012$ , соответственно). У лиц, страдающих множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами, достоверных различий тестируемого параметра по сравнению с нормой выявлено не было ( $p=0,065$  и  $p=0,059$ ) (табл. 16).

У пациентов с хроническим описторхозом (без эозинофилии) содержание eotaxin в сыворотке крови было выше на 22% (по сравнению с нормальными значениями) ( $p=0,021$ ) (табл. 17).

Таблица 17

Содержание eotaxin в сыворотке крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией (Me (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>))

Характеристика обследованных		Уровень eotaxin, пг/мл	Р-парные
Здоровые доноры		1	58,95 (50,11-66,95)
Пациенты с хроническим описторхозом без эозинофилии		2	72,00 (51,19-91,21)
Пациенты с описторхозом с эозинофилией	острый	3	74,84 (41,91-93,29)
	хронический	4	70,98 (60,53-79,08)
Р-межгрупповая			0,024

В проведенном нами исследовании содержания eotaxin в сыворотке крови у пациентов с описторхозом с эозинофилией регистрировалось статистически значимое повышение продукции указанного хемокина относительно аналогичного параметра у здоровых индивидуумов. Так, при остром описторхозе концентрация цитокина превышала норму в среднем на 27%, а при хроническом описторхозе, ассоциированном с эозинофильной реакцией, на 20% ( $p=0,003$  и  $p=0,045$ , соответственно) (табл. 17). Уровень продукции eotaxin у больных острым и хроническим описторхозом с

эозинофилией не имел достоверных отличий от аналогичного показателя в группе сравнения без эозинофилии ( $p=0,061$  и  $p=0,112$ , соответственно) (табл. 17).

При исследовании выраженности апоптотической гибели эозинофилов, полученных у здоровых доноров, в условиях инкубации клеток *in vitro* с добавлением в культивируемую среду  $\gamma$ -eotaxin отмечалось значимое снижение (на 11% и 26%, соответственно) относительного и абсолютного содержания эозинофилов, экспрессирующих фосфатидилсерин на своей поверхности, по сравнению с аналогичными показателями спонтанного апоптоза ( $p<0,05$  во всех случаях) (табл. 18).

Таблица 18

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с гемобластомами, ассоциированными с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с рекомбинантной формой eotaxin ( $\gamma$ -eotaxin) ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия инкубации <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Инкубация с $\gamma$ -eotaxin	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94 $\pm$ 1,09	0,019 $\pm$ 0,001	8,32 $\pm$ 1,02 $p^*<0,05$	0,010 $\pm$ 0,000 $p^*<0,05$
Пациенты с лимфогранулематозом	2	4,61 $\pm$ 0,86	0,178 $\pm$ 0,011	4,19 $\pm$ 1,02 $p^*>0,05$	0,121 $\pm$ 0,003 $p^*<0,05$
Пациенты с множественной миеломой	3	3,35 $\pm$ 0,07	0,023 $\pm$ 0,001	3,89 $\pm$ 0,77 $p^*>0,05$	0,027 $\pm$ 0,001 $p^*>0,05$
Пациенты с лимфомами неходжкинскими	4	4,34 $\pm$ 0,67	0,059 $\pm$ 0,002	3,08 $\pm$ 0,70 $p^*>0,05$	0,072 $\pm$ 0,002 $p^*>0,05$
Р-межгрупповая		0,017	0,021	0,001	0,016
Р-парные		$P_{1-2}=0,015$ $P_{1-3}=0,034$ $P_{1-4}=0,020$ $P_{2-3}=0,099$ $P_{2-4}=0,166$ $P_{3-4}=0,067$	$P_{1-2}=0,001$ $P_{1-3}=0,190$ $P_{1-4}=0,028$ $P_{2-3}=0,011$ $P_{2-4}=0,005$ $P_{3-4}=0,045$	$P_{1-2}=0,015$ $P_{1-3}=0,004$ $P_{1-4}=0,001$ $P_{2-3}=0,121$ $P_{2-4}=0,089$ $P_{3-4}=0,095$	$P_{1-2}=0,001$ $P_{1-3}=0,044$ $P_{1-4}=0,011$ $P_{2-3}=0,007$ $P_{2-4}=0,021$ $P_{3-4}=0,018$

При анализе данных влияния  $\gamma$ -eotaxin на содержание апоптотических эозинофилов крови, полученных у пациентов с гемобластомами, ассоцииро-



ванными с эозинофилией, регистрировалось достоверное снижение (по сравнению с нормой) уровня относительного и абсолютного числа клеток, вступивших в апоптоз (в 2 и 12,1 раза - при лимфогранулематозе ( $p=0,015$  и  $p=0,001$ , соответственно), в 2,1 и 2,7 раза - при множественной миеломе ( $p=0,004$  и  $p=0,044$ , соответственно), а также в 2,7 и 7,2 раза - при неходжкинских лимфомах ( $p=0,001$  и  $p=0,011$ , соответственно). Число аннексин-положительных клеток при инкубации эозинофилов, полученных у пациентов с множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами, в среде с добавлением  $\gamma$ -eotaxin не имело достоверных различий по сравнению с уровнем их спонтанной гибели ( $p>0,05$ ). У больных злокачественной гранулемой абсолютное количество апоптотически измененных эозинофилов в среде с  $\gamma$ -eotaxin было снижено в 1,5 раза по сравнению с показателями интактного уровня ( $p<0,05$ ) (табл. 18).

При инкубации эозинофилов больных описторхозом в среде с  $\gamma$ -eotaxin также отмечалось достоверное снижение (по сравнению со здоровыми донорами) относительного числа клеток в апоптозе при остром описторхозе в 2,3 раза, при хроническом в 1,8 раза ( $p=0,011$  и  $p=0,020$ , соответственно). Наряду с этим регистрировалось статистически значимое уменьшение относительного и абсолютного числа апоптотически измененных эозинофилов по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза (в 2,0 и 2,4 раза у больных острым описторхозом ( $p<0,05$  и  $p<0,01$ , соответственно); в 2,2 и 1,8 раза при хроническом описторхозе ( $p<0,05$  и  $p<0,05$ , соответственно)) (табл. 19).

Таким образом, у всех обследованных лиц с гиперэозинофилией крови выявлялось повышенное содержание eotaxin в сыворотке крови. Инкубация эозинофильных лейкоцитов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, с  $\gamma$ -eotaxin позволила выявить отсутствие чувствительности клеток к антиапоптотическому влиянию данного хемокина; напротив, у больных описторхозом в эксперименте

отмечена повышенная чувствительность эозинофилов к апоптозингибирующему действию eotaxin.

Таблица 19

Содержание апоптотических эозинофилов крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, в условиях культивирования *in vitro* с рекомбинантной формой eotaxin (r-eotaxin) ( $\bar{X} \pm m$ )

Характеристика обследованных		Условия инкубации <i>in vitro</i>			
		Интактная культура		Инкубация с r-eotaxin	
		%	$\cdot 10^9/\text{л}$	%	$\cdot 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	1	14,94±1,09	0,019±0,001	8,32±1,02 p* $<$ 0,05	0,010±0,000 p* $<$ 0,05
Пациенты с острым описторхозом	2	7,21±0,92	0,388±0,012	3,64±0,61 p* $<$ 0,05	0,164±0,017 p* $<$ 0,01
Пациенты с хроническим описторхозом	3	9,93±0,96	0,221 ±0,009	4,49±0,60 p* $<$ 0,05	0,121±0,003 p* $<$ 0,05
P-межгрупповая		0,038	0,002	0,011	0,019
P-парные		P <sub>1-2</sub> =0,025 P <sub>1-3</sub> =0,054 P <sub>2-3</sub> =0,067	P <sub>1-2</sub> $<$ 0,001 P <sub>1-3</sub> =0,008 P <sub>2-3</sub> =0,041	P <sub>1-2</sub> =0,011 P <sub>1-3</sub> =0,020 P <sub>2-3</sub> =0,501	P <sub>1-2</sub> $<$ 0,001 P <sub>1-3</sub> =0,023 P <sub>2-3</sub> =0,038

### 3.3.4. Уровень апоптотически измененных эозинофилов, полученных у больных с эозинофилией, в условиях их инкубации *in vitro* в бессывороточной среде

Количество полученных у здоровых доноров эозинофильных гранулоцитов, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы, при культивировании их в условиях лишения ростовых факторов (бессывороточная среда) достоверно превышало аналогичные параметры в интактной культуре и составляло 26,81±2,68% и  $(0,033 \pm 0,002) \cdot 10^9/\text{л}$  (p $<$ 0,05 и p $<$ 0,05, соответственно) (табл. 6).

При оценке характера апоптотической гибели эозинофилов, полученных у пациентов с неопластическими заболеваниями системы крови, сопровождавшимися эозинофилией, в бессывороточной среде отмечалось значимое увеличение относительного количества эозинофильных клеток, находящихся на ранней стадии реализации танатогенной программы, по сравнению с интактной культурой. Так, у больных лимфогранулематозом тестируемый

нами показатель увеличился в 11,3 раза, у больных множественной миеломой - в 13,1 раза, а у пациентов с неходжкинскими лимфомами - в 12,7 раза ( $p < 0,05$  во всех случаях) (табл. 6). Отмечалось значимое повышение абсолютного числа клеток, подвергшихся апоптозу в бессывороточной среде, по сравнению с его спонтанным уровнем (соответственно, - в 3,7, 10,2 и 4,8 раза ( $p < 0,05$  во всех случаях)) (табл. 6).

Следует отметить, что регистрировалось увеличение по сравнению со здоровыми донорами относительного количества эозинофильных гранулоцитов, вступивших в реализацию апоптоза, при культивировании в бессывороточной среде, в 1,9 раз у пациентов с болезнью Ходжкина, в 1,6 раз у больных множественной миеломой и в 2 раза у лиц с неходжкинскими лимфомами ( $p = 0,009$ ,  $p = 0,015$  и  $p = 0,021$ , соответственно) (табл. 6).

В ходе проведенного нами исследования было зафиксировано увеличение по сравнению с нормой относительного и абсолютного содержания апоптотических эозинофилов при культивировании в бессывороточной среде, полученных у пациентов с острым (в 1,4 и 63,3 раза;  $p = 0,029$  и  $p < 0,001$ , соответственно) и хроническим описторхозом (в 1,6 и 22,6 раза;  $p = 0,041$  и  $p < 0,001$ , соответственно) (табл. 7). Следует отметить, что у пациентов обеих категорий с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией крови, относительное и абсолютное количество аннексин-положительных клеток превышало аналогичные значения их спонтанной гибели: в 5,4 и 5,3 раза - при остром описторхозе ( $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ , соответственно), в 4,2 и 3,4 раза - при хроническом гельминтозе ( $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ , соответственно) (табл. 7).

Таким образом, у всех обследованных пациентов с эозинофилией крови регистрировалось снижение уровня спонтанного апоптоза эозинофилов. При инкубации клеток, полученных у больных гемобластозами, с рекомбинантными цитокинами (r-IL-3, r-IL-5 и r-eotaxin) обращало на себя внимание отсутствие антиапоптотического эффекта последних, что свидетельствует о нарушении передачи цитокинового сигнала. При инкубации эозинофилов

пациентов с описторхозом *in vitro* с рекомбинантными формами цитокинов отмечалось снижение относительного количества апоптотических эозинофилов по сравнению с их спонтанным уровнем.

Выявленные в ходе нашего исследования нарушения реализации программированной гибели эозинофильных гранулоцитов, а также изменения цитокинпродуцирующей функции мононуклеарных лейкоцитов могут лежать в основе механизмов формирования эозинофилии крови.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно данным литературы, «большие эозинофилии крови» - состояния, при которых количество эозинофильных лейкоцитов в периферической крови превышает 15% [Гриншпун Л.Д., Виноградова Ю.Е., 1983]. На сегодняшний день для обозначения этого синдрома наиболее популярным стал термин, используемый в зарубежной литературе, – «гиперэозинофильный синдром». Его классифицируют на симптоматический (или вторичный), с которым наиболее часто сталкиваются врачи в своей повседневной практике, и идиопатический варианты [Хорошко Н.Д. и соавт., 1997]. Круг нозологических единиц, сопровождаемых симптоматическим гиперэозинофильным синдромом, весьма широк: к их числу относятся различные инфекционные болезни, прежде всего паразитарные инвазии, аллергические, аутоиммунные, онкологические заболевания, а также лекарственная эозинофилия [Коровина Н.А. и соавт., 2002; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004]. Идиопатический вариант гиперэозинофильного синдрома в повседневной практике врачей встречается редко. Критериями этого состояния, по данным M.J. Chusid et al., [1975], являются гиперэозинофилия крови (более 1500 клеток/мкл), сохраняющаяся не менее 6 месяцев, полиорганная патология, связанная с циркуляцией в крови и/или пролиферацией в органах эозинофильных лейкоцитов (фиброзирующий альвеолит, гепато- и спленомегалия, фиброзирующий эндомиокардит с развитием хронической сердечной недостаточности и др.) [Хорошко Н.Д. и соавт., 1997, 1998; Анаев Э.Х., 2002; Егоров И.В., Котина Л.Н., 2004].

Среди механизмов эозинофилии, известных на сегодняшний день, выделяют антителозависимый хемотаксис, развивающийся при участии IgE-или IgG-антител при паразитозах; иммунный механизм при аллергии, опосредованный через IgE; ответ на эозинофильный хемотаксический фактор, выделяемый некоторыми опухолями; собственно опухолевая эозинофилия [Абрамычев А.Н. и соавт., 1984; Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 1998].

В реализации противогельминтного иммунитета важная роль принадлежит эозинофильным лейкоцитам, обладающим высоким цитотоксическим потенциалом. При этом существенное значение придается антителозависимому хемотаксису эозинофилов в очаг, реализуемому при участии IgE- или IgG-антител. Как упоминалось ранее, эозинофильные лейкоциты содержат на клеточной поверхности низкоаффинные и высокоаффинные рецепторы для Fc-фрагмента IgE (FcεRII и FcεRI, соответственно) и IgG [Abdelilah S.G. et al., 1998]. Для привлечения этих клеток в очаг необходимо формирование комплекса антиген-антитело. Прикрепляясь к мембране паразита, покрытой вышеупомянутыми антителами с помощью Fc-рецептора, эозинофилы получают сигнал для синтеза и высвобождения высокотоксичных протеинов (большой основной белок, эозинофильный катионный протеин, эозинофильная пероксидаза), вызывающих гибель гельминтов. Поэтому гиперэозинофилия, формирующаяся при миграции личинок паразитов, является важным звеном в антигельминтной защите организма [Хаитов Р.М., 2000; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Другой важный механизм формирования эозинофилии крови связан с участием этих клеток в реакциях гиперчувствительности немедленного типа (I тип аллергических реакций по P.Gell и R.Coombs, 1969). Эозинофильные гранулоциты мигрируют к месту иммунной реакции на самых ранних ее этапах, привлекаемые хемотаксическими факторами, секретируемыми сенсibilизированными T-лимфоцитами. Суть этого типа аллергических реакций заключается во взаимодействии IgE с аллергеном на поверхности тучных клеток, обуславливающим высвобождение ряда биологически активных веществ: гистамина, серотонина, гепарина, компонентов калликреин-кининовой системы, простагландинов, лейкотриенов и др. Благодаря синтезу и секреции некоторых ферментов (гистаминаза, арилсульфатаза, фосфолипаза B и D), а также способности фагоцитировать гранулы, выделяемые тучными клетками, эозинофилам принадлежит роль модуляторов аллергических реакций I типа. Кроме того, после всестороннего

подавления гиперчувствительности немедленного типа эозинофильные лейкоциты выполняют репарационную функцию, способствуя восстановлению тканевых базофилов [Медуницын Н.В., 1999; Воробьев А.И., 2002].

В литературе имеются сведения о разнообразных механизмах развития эозинофилии при гемобластозах. Так, ряд авторов указывает на способность клеток некоторых опухолей (Т-клеточная лимфома, лимфогранулематоз, лимфобластный лейкоз) продуцировать хемотаксические факторы, в том числе IL-3, IL-5, GM-CSF, опосредующих продукцию, созревание эозинофильных лейкоцитов в костном мозге, а также их мобилизацию в ткани [Kawasaki A. et al, 1991; Takai K., Sanada M., 1991; Endo M. et al., 1995; Бережная Н.М., 2000]. В то же время эозинофильная реакция может представлять собой своеобразный ответ иммунной системы на антигенную стимуляцию опухолевой тканью [Гриншпун Л.Д., Виноградова Ю.Е., 1983]. И, наконец, существует эозинофильный лейкоз, в основе которого лежит опухолевая пролиферация эозинофильных клеток [Коровина Н.А. и соавт., 2002].

Наряду с изложенными выше точками зрения на механизмы формирования эозинофилии крови в литературе последних лет появилось мнение о том, что одним из ключевых факторов развития этого синдрома может быть подавление или дефекты апоптоза ацидофильных гранулоцитов [Druilhe A. et al., 1996; Воробьев А.И., 2002].

На сегодняшний день наиболее изучены молекулярные механизмы дисрегуляции апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме. Согласно современным данным, эозинофильным лейкоцитам отводится ключевая роль в патогенезе этого заболевания. Эозинофилы, благодаря наличию содержимого гранул, являются главными эффекторными клетками, обуславливающими повреждение эпителия дыхательных путей, формирование и персистенцию воспаления при астме [Куропатенко М.В., Желенина Л.А., 2005; Мамонтова Т.В., Кайдашев И.П., 2005; Райкис Б.Н., Гогужева М.Н., 2006].

Существует мнение, согласно которому снижение или дефект апоптоза эозинофильных гранулоцитов являются одним из ключевых факторов формирования эозинофилии крови при бронхиальной астме [Druilhe A. et al., 1996, 2000]. Установлено, что в биоптатах бронхов уровень апоптотически измененных эозинофилов ниже, чем у здоровых, и прогрессивно снижается с нарастанием тяжести заболевания [Vignola A.M. et al., 1999; Duncan C.J. et al., 2003].

Известно, что одним из наиболее изученных на сегодняшний день индукторов апоптотической гибели клетки является FasL, опосредующий свой эффект путем связывания с Fas-рецептором, локализуемым на клетках разных типов. Для этого рецептора не установлено других функций, кроме проведения сигнала к апоптозу [Ярилин А.А., 1998]. В исследовании A. Druilhe et al. [1996] у пациентов с бронхиальной астмой угнетение апоптоза эозинофильных клеток сочеталось с отсутствием активации FasR и FasL, осуществляющих запуск реализации запрограммированной гибели эозинофилов у здоровых лиц. Вместе с тем другой группой исследователей у данной категории больных обнаружено значительное увеличение содержания растворимого Fas-рецептора в сыворотке крови, что, по-видимому, может быть причиной ингибирования Fas-зависимого апоптоза эозинофилов [Kato M. et al., 1999].

Другим фактором, обеспечивающим запуск запрограммированной гибели, является белок p53, экспрессируемый при возникновении повреждений в геноме клетки. Его функция заключается во временной остановке клеточного цикла в G<sub>1</sub>-фазе с помощью белка p21<sup>WAF1</sup>, ингибирующего циклинзависимые киназы, и стимуляции апоптоза путем активации генов Bax или Bid – и/или активации образования свободных форм кислорода, способствующих выходу цитохрома c из митохондрий [Владимирская Е.Б., 2002; Мойбенко А.А. и соавт., 2005; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006]. Между тем установлено, что у пациентов с бронхиальной астмой в эозинофилах крови экспрессия гена p53 снижена [Деев И.А. и соавт., 2004].



Несомненно, что важная роль в запуске и реализации программированной гибели клетки принадлежит белкам семейства Bcl-2, являющихся модуляторами апоптоза в связи с их способностью как активировать, так и ингибировать этот процесс. Разными авторами было показано, что в эозинофилах пациентов, страдающих бронхиальной астмой, существенно повышена экспрессия мРНК антиапоптотических белков семейства Bcl-2, что коррелировало с тяжестью заболевания [Vignola A.M. et al., 1999; Деев И.А., 2004], а A.S. Jang et al. [2000] обнаружили повышенную экспрессию белка bcl-2.

Приведенные выше молекулярные механизмы нарушения апоптоза эозинофилов могут явиться результатом действия разных индуцирующих факторов, к числу которых прежде всего относится дисбаланс цитокиновой сигнализации. Исходя из этих позиций, при рассмотрении феномена гиперэозинофилии в настоящем исследовании мы сконцентрировали наше внимание на цитокиноопосредованной модуляции апоптоза эозинофильных гранулоцитов (моделью исследования явились лимфопролиферативные заболевания системы крови и описторхоз, сопровождавшиеся развитием больших эозинофилий крови). На первом этапе настоящего исследования тестировалась выраженность апоптоза эозинофилов у пациентов с гиперэозинофильным синдромом. Так, у пациентов с гемобластозами было отмечено снижение относительного содержания эозинофилов, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы, при их культивировании в условиях полной питательной среды. Выявленные изменения носили однонаправленный характер вне зависимости от нозологии (табл. 6). Изучение выраженности апоптоза эозинофильных лейкоцитов у пациентов с острым описторхозом позволило установить снижение числа аннексин-позитивных клеток, в то время как у лиц с хроническим описторхозом этот показатель не снижался до статистически значимого уровня (табл. 7). Было установлено, что при инкубации эозинофилов, полученных у пациентов с неопластическими заболеваниями

системы крови, а также у лиц, страдающих гельминтозом, вызванным *O. felineus*, сопровождавшимся эозинофилией, в бессывороточной среде число погибших клеток (по сравнению с интактной культурой) увеличивается, что свидетельствует о повышении чувствительности эозинофильных клеток к проапоптотическим стимулам при данных нозологиях. Исходя из данных литературы о том, что ингибирование апоптоза эозинофилов является основой формирования эозинофилии [Simon H. et al., 1995, 1997; Воробьев А.И., 2002], становится очевидным, что выявленное нами нарушение программированной гибели ацидофильных гранулоцитов у больных гемобластозами и описторхозом может лежать в основе механизмов возникновения большой эозинофилии крови при данных заболеваниях.

Апоптоз эозинофилов, как и любой другой физиологический процесс, сопряжен с регуляцией разнообразными стимулами, включающими среди всего прочего цитокины, вырабатываемые различными клетками и самими эозинофилами. В исследованиях *in vitro* установлено, что ряд цитокинов обладает способностью увеличивать продолжительность жизни эозинофильных гранулоцитов, регулируя процесс их программированной гибели. К ним относятся IL-5, IL-3 и GM-CSF [Tai P.C. et al., 1991; Yamaguchi Y. et al., 1991; Simon H. et al., 1997; Simon H., Alam R., 1999].

В этой связи, выявив факт нарушения программированной гибели эозинофилов при больших эозинофилиях крови, на втором этапе исследования нами была проведена оценка механизмов цитокинопосредованной регуляции апоптоза эозинофильных гранулоцитов у обследованных больных.

В настоящее время хорошо изучено биологическое действие IL-5 в отношении регуляции эозинофилов. Он является одним из ключевых цитокинов, влияющим на образование, созревание, активацию и численность эозинофильных лейкоцитов [Lopez A.F. et al., 1988] (рис. 2). IL-5 преимущественно воздействует на поздние стадии эозинофилопоэза, специфичен для лейкоцитов эозинофильного ряда, в отличие от GM-CSF, обеспечивающего дифференцировку нескольких кроветворных ростков [Adachi T., Alam

R.,1998]. Среди прочих биологических свойств этот медиатор способствует пролонгированию жизни эозинофилов, ингибируя процесс их запрограммированной гибели [Yamaguchi Y., 1988; Беклемишев Н.Д., 1998]. Этот медиатор, по данным литературы, является основным цитокином, вовлеченным в развитие эозинофилии *in vivo*. Так, введение IL-5 обуславливает возникновение эозинофильной реакции у различных животных [Iwama T. et al., 1992; Chung K.F., Barnes P.J., 1999].

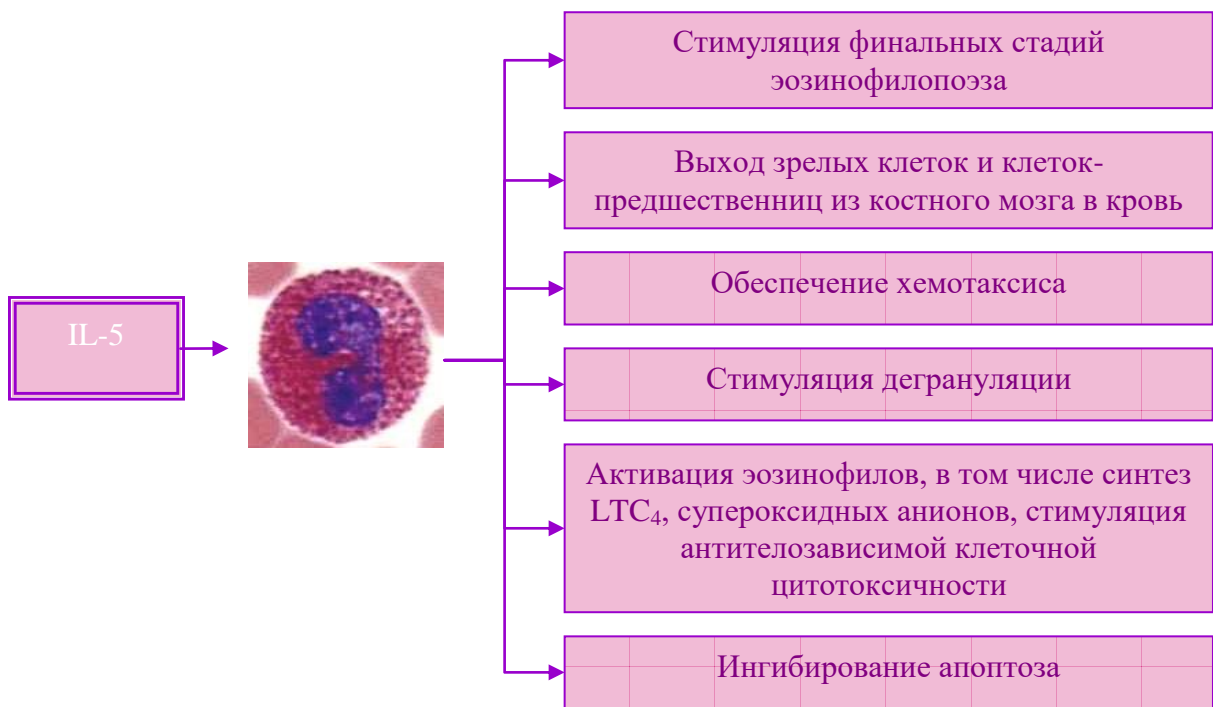


Рис. 2. Биологические эффекты IL-5 в отношении эозинофилов [по данным Н.Д. Беклемишева, 1998; А.И. Воробьева, 2002; J.G. Zangrilli, 2002]

Рецептор IL-5R представляет собой гетеродимер, состоящий из двух полипептидных цепей –  $\alpha$ -субъединицы (60-80 кДа), обеспечивающей низкоаффинное лиганд-специфическое связывание и состоящей из растворимой и мембраносвязанной форм, которые конкурируют друг с другом за связывание IL-5, и  $\beta$ -субъединицы (120-140 кДа), необходимой для проведения специфического сигнала внутрь клетки и идентичной  $\beta$ -субъединицам в структуре рецепторов IL-3 и GM-CSF [Miyajima A. et al., 1993; Gregory V. et al., 2003]. Мембраносвязанная форма  $\alpha$ -субъединицы, взаимодействуя с  $\beta$ -субъединицей, ведет к существенному увеличению

аффинитета к IL-5 [Koike M., 1994]. Примечательно, что рецептор к IL-5 на своей поверхности несут только эозинофилы и базофилы, он не экспрессируется нейтрофилами и моноцитами [Chihara J. et al., 1990].

Сигнальная трансдукция IL-5, как IL-3 и GM-CSF, включает ряд последовательных этапов (рис. 3). Рассмотрим основные из них. После связывания IL-3, IL-5 и GM-CSF с  $\alpha$ -субъединицей соответствующего рецептора происходят общие внутриклеточные события, начальным этапом которых является фосфорилирование ряда цитоплазматических белков и  $\beta$ -субъединицы рецептора. В связи с тем, что ни  $\alpha$ -, ни  $\beta$ -субъединицы рецептора не содержат в своем составе киназного домена в цитоплазматической части, в первую очередь в этот процесс вовлекаются мембранно-связанные тирозин-киназы [Adachi T., Alam R., 1998]. Было показано, что Lyn [Li Y., 1995], Fes и Jak2 [Brizzi M.F., 1996] тирозин-киназы связаны с  $\beta$ -субъединицей рецептора. Эффект IL-5 реализуется посредством нескольких сигнальных путей, включающих активацию тирозин-киназ Lyn, Syk, и Jak2 (Janus kinase 2), фосфорилирование STAT (signal transducers and activators of transcription) и активацию Ras-Raf-MEK-ERK пути [Yousefi S., 1994, 1996; Alam R., 1995; van der Bruggen T., 1995; Bates M.E., 1996; Ogata N. et al., 1997; Caldenhoven E. et al., 1998; Coffey P.J., 1998; Pazdrak K. et al., 1998]. Среди клеток миелоидного ряда под действием IL-3 и GM-CSF показана активация таких тирозин-киназ, как Lyn [Corey S., 1993; Anderson S.M., 1995], Yes [Corey S., 1993], Fyn [Anderson S.M., 1995], Hck [Anderson S.M., 1995] и Jak-2 [Watanabe S., 1996].

Помимо этого, в цитозоле существуют сигнальные молекулы, способные перемещаться от рецептора к другим клеточным структурам. На пути передачи сигнала от мембрано-связанных тирозин-киназ цитозольным молекулам существует ряд адаптерных белков, служащих местом связывания цитозольных сигнальных молекул или формирующих с ними мультимолекулярные комплексы, которые в дальнейшем транспортируются к различным клеточным мишеням. Так, в ответ на стимуляцию IL-3, IL-5 и GM-CSF

адаптерный белок Shc связывается с  $\beta$ -цепью и подвергается фосфорилированию [Cutler R. L., 1993; Dorsch M., 1994; Matsuguchi T., 1994]. Тирозинфосфатаза, SHP-2 (Syp, PTP1D, SHPTP2), активируясь после стимуляции IL-3 и IL-5, взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей посредством его SH2 домена. Фосфорилированный по остаткам тирозина SHP-2 формирует участок связывания для Grb2, что, в свою очередь, ведет к активации Ras-сигнального пути [Welham M.J. et al., 1994; Pazdrak K. et al., 1997].



Рис. 3. Активация внутриклеточных сигнал-трансдукторных систем IL-5. Обозначения: Akt, Jak, MAPK, Ras – киназы, PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа, c-fos, c-jun, CREB, NF- $\kappa$ B, STAT5 – транскрипционные факторы [по данным Adachi T., Alam R., 1998; J.M. Wang et al., 1999; H.-M. Huang, 2000]

IL-3, IL-5 и GM-CSF активируют фосфатидилинозитол-3-киназу (Phosphatidylinositol-3-kinase - PI3K), принимающую участие в различных процессах: транспорт глюкозы, окислительный стресс, передача митогенных сигналов и ряд других [Sato N. et al., 1993; Gold M.R. et al., 1994; Sato S. et al., 1994]. Поскольку  $\beta$ -субъединица не имеет соответствующего участка для связывания PI3K, существуют молекулы, осуществляющие взаимосвязь между ними. Полагают, что к ним относится SHP-2, который ассоциируется с

$\beta$ -цепью рецептора и p85 субъединицей PI3K после воздействия IL-3 и GM-CSF [Welham M.J. et al., 1994]. Вместе с тем M. Jucker и R.A. Feldman [1995] описали белок p80, тесно ассоциированный не только с киназами Src/Yes и Lyn, но и  $\beta$ -субъединицей рецептора и p85 PI3K. Было показано, что в механизмах сигнальной трансдукции IL-3 тирозин-киназа Tec связывает  $\beta$ -цепь рецептора с PI3K посредством киназы Jak2 [Takahashi-Tezuka M. et al., 1997]. В свою очередь, PI3K передает сигнал ряду серин/треониновых киназ таким, как атипичный изофермент протеинкиназы C (aPKC) [Nakanishi H. et al., 1993; Toker A. et al., 1994], Akt, c-jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) и p70 S6 киназа [Klippel A. et al., 1996].

Следующий этап передачи цитокинового сигнала включает активацию мобильных цитозольных молекул, которые в последующем транспортируются к клеточным мишеням, в частности к транскрипционным факторам. Активация последних и их перемещение в ядро клетки ведет к инициации транскрипции соответствующих генов.

Итогом активации различных адаптерных протеинов является активация p21 G-белков, наиболее изученным из которых является Ras. Этот белок известен способностью привлекать Raf-1 киназу в область плазматической мембраны, где она в последующем активируется тирозинкиназами, белком 14-3-3 и, возможно, протеинкиназой C. Raf-1 через активацию MAP или ERK (MEK) киназ регулирует внеклеточную ERK киназу (extracellular signal-regulated kinase) – члена семейства MAPK. ERK осуществляет позитивную регуляцию индукции транскрипционного фактора *c-fos*. IL-3, IL-5 и GM-CSF, по данным ряда авторов, стимулируют этот сигнальный каскад, то есть активируют Ras, Raf и ERK [Okuda K. et al., 1992; Raines M.A., 1992; Welham M.J. et al., 1992].

Установлено, что в проведении сигнала от рецептора IL-5 принимают участие Jak-1, Jak-2 – представители семейства Janus киназ, вовлекающих транскрипционные факторы - STAT белки (signal transducers and activators of transcription) [Ogata N. et al., 1998]. После связывания рецептора с цитокином

Janus-киназы фосфорилируют внутриклеточные участки цепей рецепторов по остатку тирозина, после чего к этим участкам через SH2-домен могут присоединяться молекулы семейства STAT. Затем те же киназы фосфорилируют молекулы STAT по остатку тирозина, которые впоследствии отделяются от внутриклеточных цепей рецептора, димеризуются и в таком виде перемещаются в ядро. Взаимодействуя с ДНК клетки, STAT белки активируют транскрипцию ряда генов [Хайтов Р.М., 2000]. IL-3, GM-CSF, и IL-5 главным образом используют гомологи STAT5, в настоящее время известные как STAT5A и STAT5B [Mui A.L. et al., 1995]. Помимо STAT5, эти цитокины также активируют STAT1, STAT3 и STAT6 [Caldenhoven E. et al., 1995; Quelle F.W., 1995; Brizzi M.F., 1996; Nagata Y., 1996]. Наряду с привлечением STAT молекул, для Jak-2 показана активация Ras-МАРК пути (Ras-mitogen-activated protein kinase) (непосредственная и через субъединицу рецептора) [Adachi T., Alam R., 1998].

Обобщая сказанное выше, отметим, что в процессе сигнальной трансдукции IL-5 активируется несколько систем внутриклеточной коммуникации: каскады Ras-МАРК, путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), а также JAK-STAT.

Кроме того, в ингибирование программированной гибели лейкоцитов эозинофильного ряда существенный вклад вносят обусловленная IL-5 стимуляция продукции антиапоптотических белков bcl-x<sub>L</sub>, bcl-2 [Ochiai K. et al., 1997; Dibbert B. et al., 1998]; ингибирование транспортировки к митохондриям белка bax, обладающего проапоптотическими свойствами; нарушение высвобождения цитохрома c [Dewson G. et al, 2001].

Учитывая важную роль IL-5 в регуляции апоптоза эозинофилов, нами было проведено исследование, направленное на оценку продукции мононуклеарами IL-5, а также реализации IL-5-опосредованного апоптоза эозинофильных гранулоцитов. Были получены фактические данные, согласно которым у больных лимфопролиферативными заболеваниями, ассоциированными с эозинофильной реакцией крови, отмечалось достоверное

увеличение (по сравнению с контролем и группой сравнения без эозинофилии) содержания IL-5 в супернатантах мононуклеарных культур (табл. 8). В то же время у всех больных с гемобластозами вне зависимости от нозологии регистрировалось снижение индекса стимуляции IL-5 по сравнению с контрольным уровнем (табл. 8), что свидетельствует об угнетении потенциального резерва мононуклеарных клеток продуцировать данный цитокин (рис. 4).

Выявленный нами высокий уровень IL-5 у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, по-видимому, обусловлен прямой (антигенной) и опосредованной (продукция цитокинов IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF) стимуляцией опухолевыми клетками Th2-лимфоцитов [Kawasaki A et al., 1991; Takai K., Sanada M., 1991; Трапезников Н.Н. и соавт., 1996; Волкова М.А., 2001].

При гельминтозе, вызванном *O.felineus* и ассоциированном с эозинофилией крови, также регистрировалось статистически значимое повышение продукции мононуклеарами крови IL-5 по сравнению с больными без эозинофилии и здоровыми индивидуумами (табл. 8). Как известно, одним из ключевых факторов в формировании механизмов иммунного ответа на антигены гельминтов является активация Th2 лимфоцитов [Озерецковская Н.Н., 2000]. Эта субпопуляция лимфоцитов обладает способностью вырабатывать различные цитокины, в том числе и IL-5 [Кетлинский С.А., 2002], высокий уровень продукции которого у пациентов с описторхозом может быть, в частности, объяснен этим фактом. Индекс стимуляции продукции IL-5 у больных острым и хроническим описторхозом оказался сниженным (табл. 4), что свидетельствует об истощении резервных возможностей мононуклеаров крови вырабатывать указанный медиатор в условиях стимуляции их внутриклеточного метаболизма (рис. 4).

В дальнейшем нами проводилось исследование реализации апоптотической программы эозинофильных лейкоцитов, полученных у больных



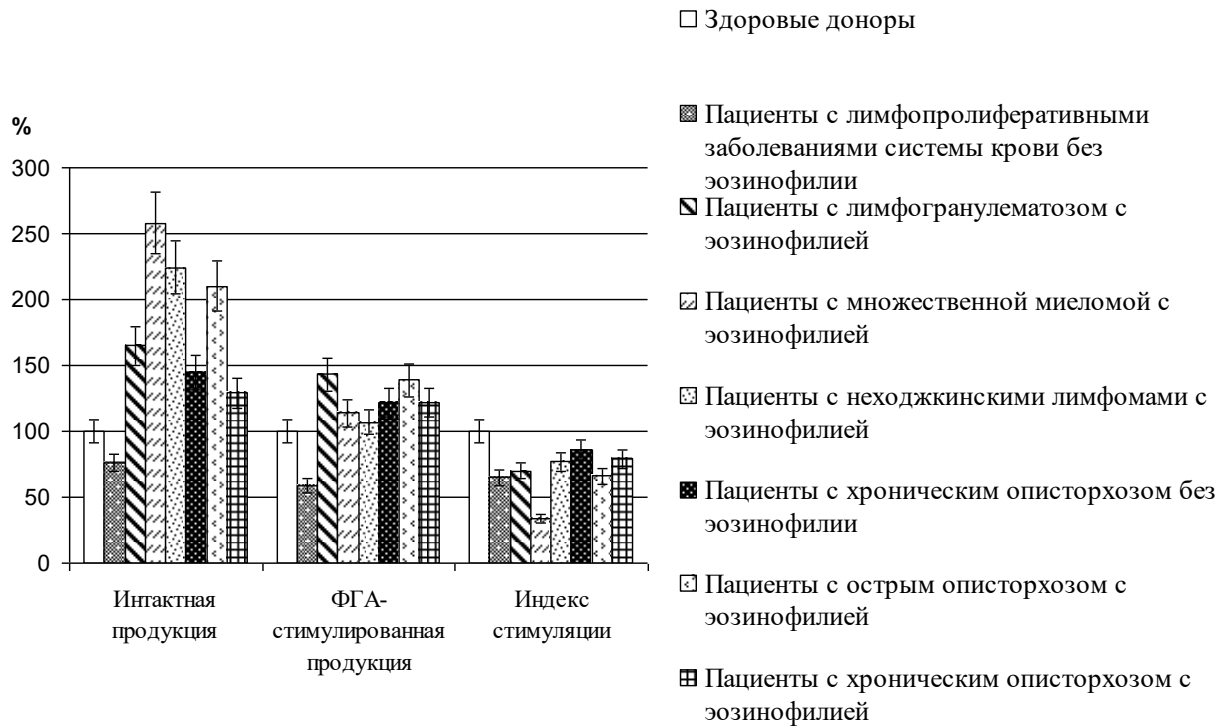


Рис. 4. Продукция IL-5 мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и описторхозом, сопровождавшимся эозинофилией

лимфопролиферативными заболеваниями, сопровождавшимися эозинофилией крови, в условиях их инкубации *in vitro* с рекомбинантной формой IL-5 (рис. 5).

При этом определялось снижение относительного и абсолютного содержания апоптотических клеток по сравнению с аналогичными показателями в контроле (табл. 10). Однако значения изученных показателей достоверно не отличались от таковых в интактных культурах (табл. 10), что свидетельствует об отсутствии чувствительности эозинофильных лейкоцитов пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови к действию IL-5. Примечательно, что аналогичный факт был ранее получен И.И. Иванчуком и соавт. [2004]. Исследователи при добавлении r-IL-5 в культуру лейкоцитов эозинофильного ряда, полученных у пациентов с бронхиальной астмой, так же не выявили изменения активности апоптотической гибели. Этот феномен авторы объясняли функциональной резистентностью клеток к действию медиатора.

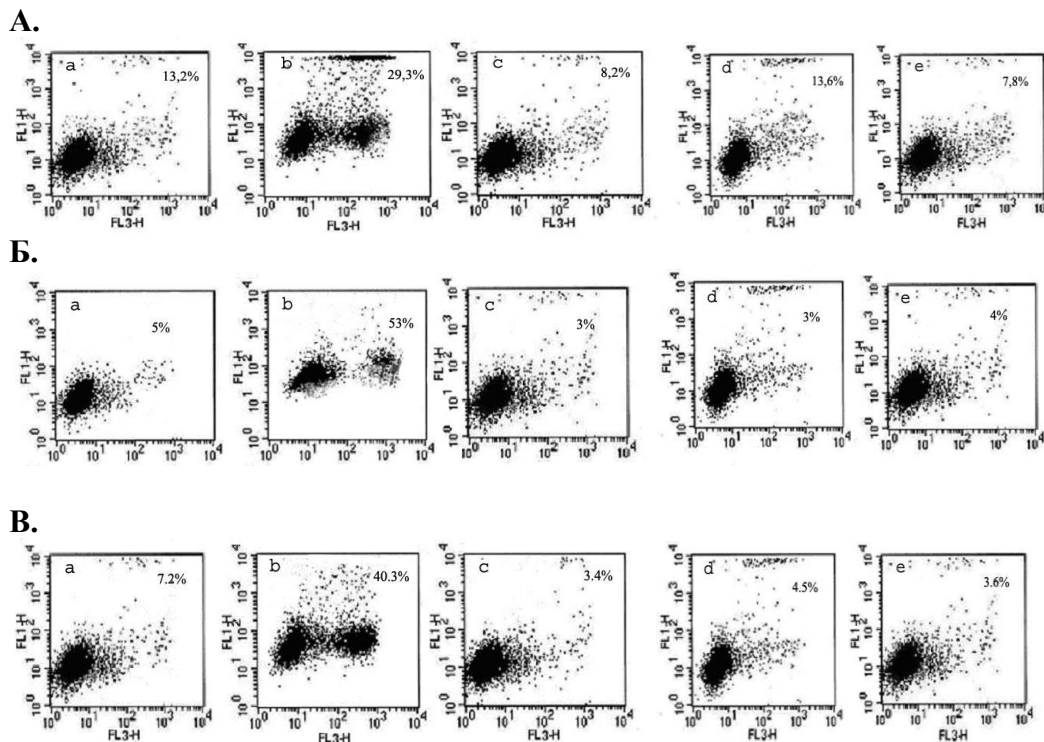


Рис. 5. Гистограммы проточно-цитометрического анализа, отражающие количество апоптотически-измененных эозинофилов крови, полученных у здорового донора (А), пациента с лимфомой Ходжкина (Б) и больного острым описторхозом (В), культивированных в питательной среде (а), при лишении ростовых факторов (бессывороточная среда) (б), при добавлении в среду инкубации r-IL-5 (с), r-IL-3(д), r-eotaxin (е).

Исследование программированной гибели гранулоцитов эозинофильного ряда, полученных у лиц с острым и хроническим описторхозом, при инкубации в среде с r-IL-5 позволило зарегистрировать достоверное снижение относительного числа клеток в апоптозе по сравнению с контролем и базальным уровнем (табл. 11), что вероятно, обусловлено увеличением экспрессии рецепторов к указанному медиатору.

IL-3 является раннедействующим гемопоэтическим фактором, наряду с другими ростовыми факторами стимулирующим пролиферацию и дифференцировку всех ростков кроветворения [Гольдберг Е.Д. и соавт., 2001] (рис. 6). Источниками этого цитокина являются активированные Т-лимфоциты и тучные клетки [Arai K.I. et al., 1990]. В отношении эозинофилов IL-3 не только обеспечивает ранние этапы созревания клеток, но и участвует в их активации, повышает выброс белков гранул [Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Регулируя процесс программированной гибели, этот цитокин

обладает способностью пролонгировать время жизни эозинофильных гранулоцитов [Tai P.C. et al., 1991] и тучных клеток [Yanagida M. et al., 1995]. Помимо этого, IL-3, как и IL-5, стимулирует хемотаксис, дегрануляцию эозинофилов, синтез LTC<sub>4</sub>, а также антителозависимую цитотоксичность [Zangrilli J.G., 2002].

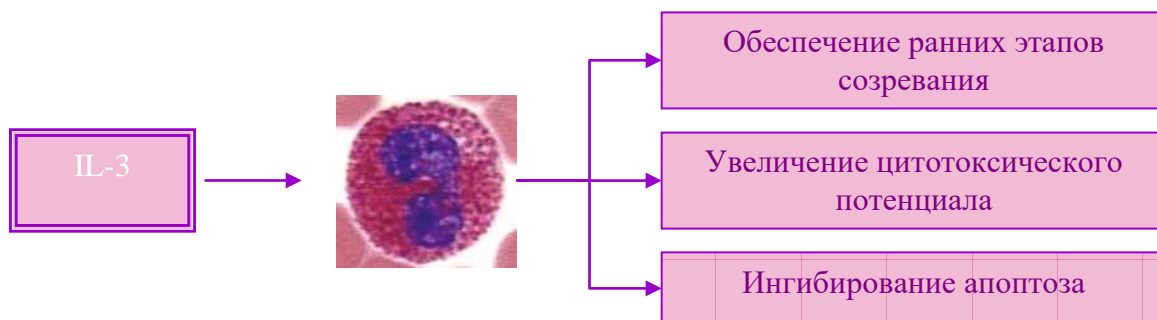


Рис. 6. Биологические эффекты IL-3 в отношении эозинофилов [по данным K.F. Chuhg, P.J. Barnes, 1999; А.И. Воробьева, 2002; J.G. Zangrilli, 2002]

Свое биологическое действие IL-3 реализует путем связывания с рецептором, состоящим из  $\alpha$ -субъединицы, специфично связывающей этот медиатор, и  $\beta$ -цепи, общей, как было сказано выше, с рецепторами IL-5 и GM-CSF и опосредующей проведение сигнала [Miyajima A. et al., 1993]. В механизмах сигнальной трансдукции IL-3 принимают участие несколько внутриклеточных сигнал-передающих систем: каскады Ras-МАРК, путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), а также Jak-STAT.

Существуют данные, что IL-3 реализует антиапоптотический эффект посредством экспрессии bcl-2 или bcl-X<sub>L</sub> [Kinoshita T., 1995; Perkins G.R. et al., 1996; Leverrier Y. et al., 1997; Wang J.M. et al., 1999]. С киназой Raf-1 ассоциируют ингибирующее влияние на апоптоз клетки белка bcl-2, который, связываясь с названной киназой, транспортирует ее из цитоплазмы к мембране митохондрий [Wang H.G. et al., 1996]. В свою очередь киназа Raf-1 фосфорилирует bad – проапоптотический белок семейства Bcl-2, который отменяет цитопротективное действие белков bcl-2 и bcl-X<sub>L</sub>, образуя с ними гетеродимеры. Лишь нефосфорилированный bad способен образовывать

указанный комплекс, вызывая гибель клетки [Gajewski T.F., 1996]. Было показано, что bad фосфорилируется после стимуляции IL-3, что раскрывает механизм антиапоптотического эффекта данного цитокина [Zha J. et al., 1996; Del Peso L., 1997]. Наряду с этим выявлено, что передача сигнала с рецептора IL-3 включает PI3K-Akt-Bad путь, что указывает на важную роль PI3K в механизмах выживания клетки посредством фосфорилирования Bad [Del Peso L. et al., 1997]. Установлено, что IL-3 стимулирует активность JNK1 – киназы семейства MAPK - посредством белка Ras [Terada K. et al., 1997]. Наряду с этим вышеуказанный медиатор активирует другую киназу этого же семейства – p38 [Nagata Y. et al., 1997]

У обследованных нами больных гемобластозами и описторхозом продукция IL-3 мононуклеарными клетками крови оказалась повышенной. При этом значения индекса стимуляции секреции этого медиатора были ниже нормы по сравнению с его уровнем у здоровых доноров, что, по нашему мнению, обусловлено снижением резервных возможностей T-лимфоцитов продуцировать IL-3 в условиях напряженности их внутриклеточного метаболизма (табл. 12, 13) (рис. 7).

При изучении влияния r-IL-3 на апоптотическую гибель эозинофильных лейкоцитов *in vitro*, полученных у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови, нами были получены весьма интересные данные: относительное и абсолютное количество клеток, несущих на своей поверхности фосфатидилсерин у лиц с множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами было увеличенным по сравнению с аналогичными параметрами в базальной пробе (табл. 14). В то же время у пациентов с лимфогранулематозом относительное и абсолютное содержание апоптотически измененных эозинофилов снижалось по сравнению с интактным уровнем, однако, не достигая достоверного различия. Следует подчеркнуть, что у всех больных гемобластозами относительное содержание клеток в апоптозе при инкубации в среде с добавлением r-IL-3 было ниже, чем в аналогичных пробах у здоровых доноров. Указанный факт свидетель-

ствует о сниженной чувствительности эозинофильных гранулоцитов у больных гемобластозами к антиапоптотическому действию ИЛ-3.

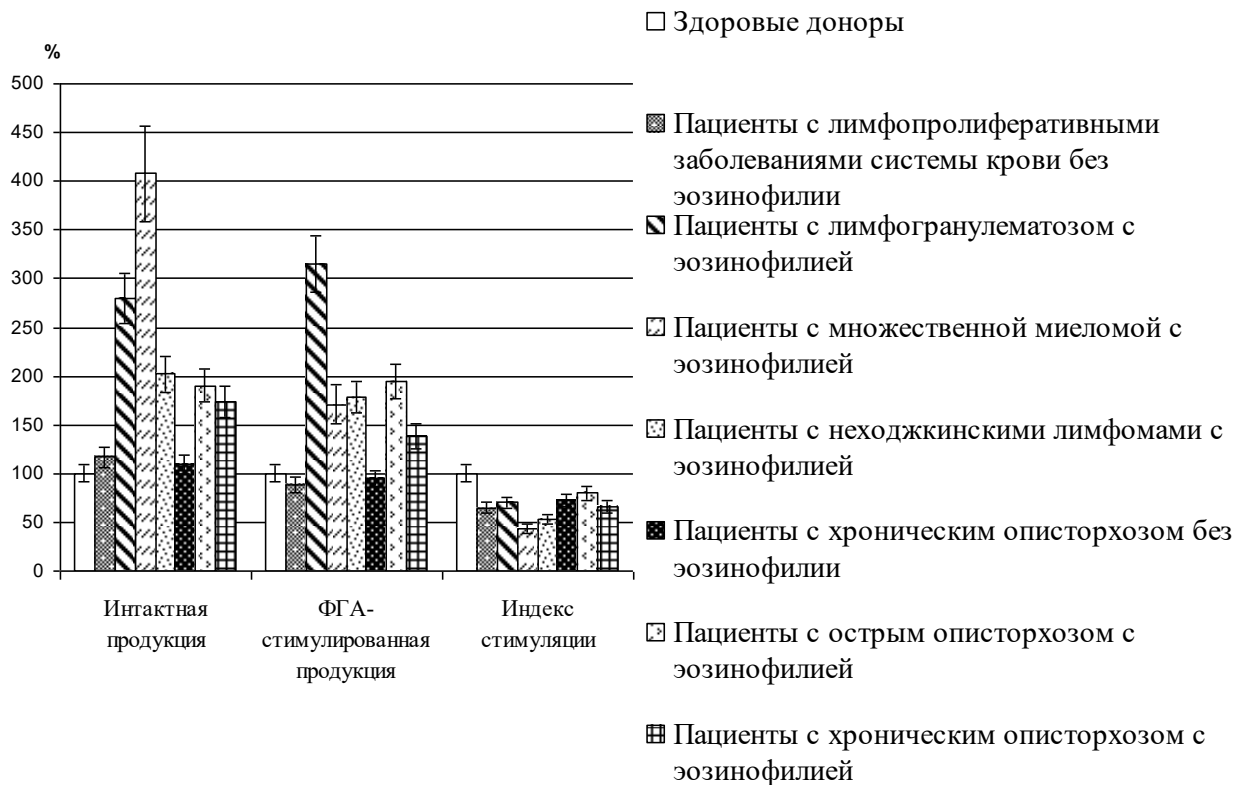


Рис. 7. Продукция ИЛ-3 мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и описторхозом, сопровождавшимся эозинофилией.

Оценивая программированную гибель лейкоцитов эозинофильного ряда у лиц, страдающих острым и хроническим описторхозом, в условиях их инкубации с г-ИЛ-3, нами было отмечено снижение апоптотической активности клеток по сравнению с контролем и интактным уровнем (табл. 15). Повышенная чувствительность эозинофильных лейкоцитов больных описторхозом к действию ИЛ-3 и ИЛ-5 обуславливает не только пролонгированное пребывание клеток в кровотоке, но и стимуляцию эозинофилопоэза, высвобождение зрелых эозинофилов из костного мозга, а также способствует активации механизмов микробицидности этих эффекторных клеток, что вносит существенный вклад в реализацию противогельминтного иммунитета.

В изучении механизмов формирования эозинофилии крови особый интерес представляет роль eotaxin - цитокина, специфично действующего в отношении эозинофильных гранулоцитов (рис. 8). Этот хемокин СС-

семейства привлекает в очаг аллергического воспаления исключительно эозинофилы, что было показано на различных моделях *in vivo*, причем этот эффект усиливается в присутствии IL-5 [Collins P.D. et al., 1995; Brown J.R. et al., 1998; Dent G. et al., 2004]. Синергизм этих цитокинов объясняется тем, что IL-5 стимулирует высвобождение зрелых клеток из костного мозга, а eotaxin обуславливает их направленную миграцию в ткани [Rollins B.J., 1997; Palframan R.T. et al., 1998]. Eotaxin также является хемоаттрактантом для Th2 лимфоцитов и базофилов, увеличивает высвобождение последними гистамина, а также синтез LTC<sub>4</sub> [Forssmann U., et al., 1997]. Опосредуя выработку супероксидных анионов, этот медиатор увеличивает цитотоксический потенциал эозинофильных гранулоцитов; стимулирует их дегрануляцию [Elsner J. et al., 1996; Rothenberg M.E., 1999]. Основными продуцентами хемокина являются эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также сами эозинофилы [Humbles A.A., 1997; Minshall E., 1997; Фрейдлин И.С., 2001].

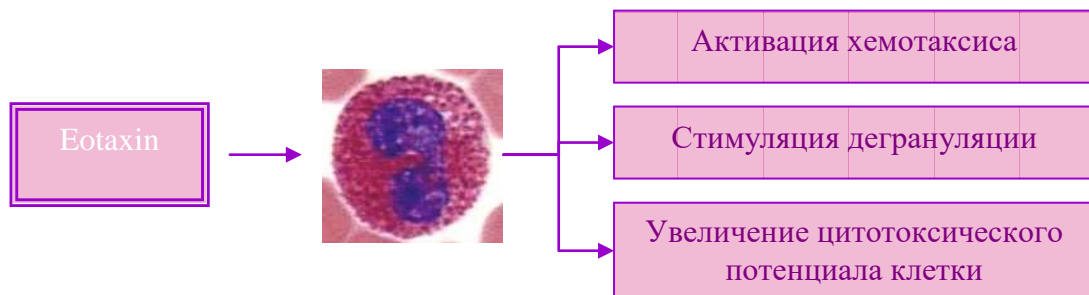


Рис. 8. Биологические эффекты eotaxin в отношении эозинофилов [по данным K.F. Chuhg, P.J. Barnes, 1999; M.E. Rothenberg, 1999; C. Murdoch, A. Finn, 2000]

Эозинофилы человека экспрессируют большое число CCR3-рецепторов для eotaxin [Heath H. et al., 1997; Тотолян А.А., 2001]. В отличие от других СС-хемокинов, eotaxin имеет высокую селективность в отношении к своему рецептору [Kitaura M., 1996; Ponath P.D., 1996]. Связывание eotaxin с CCR3-рецептором стимулирует серию биохимических изменений, включая кратковременное увеличение внутриклеточной концентрации кальция, перестройку цитоскелета, активацию MAP-киназ (mitogen-activated protein) – ERK1/ERK2 и p38 [Alam R., 1999; Zimmermann N., 1999; Kampen G.T. et al.,

2000]. CCR-3 представляет собой разнородный рецептор, взаимодействующий с разнообразными лигандами, включая MCP-2, -3, -4, RANTES и HCC-2 [Murdoch C., Finn A., 2000]. Однако единственным лигандом, который осуществляет сигнализацию исключительно посредством данного рецептора, является eotaxin [Rothenberg M.E., 1999]. Недавно экспрессия CCR3 была определена у Th-2 лимфоцитов, биологическая роль которого, однако, остается не ясной [Sallusto F., 1997]. Eotaxin не активен в отношении нейтрофилов и моноцитов, так как эти клетки не экспрессируют данный рецептор. Примечательно, что промотор гена этого хемокина содержит сайты для связывания с глюкокортикоидами, NF- $\kappa$ B, STAT-6 и IFN- $\gamma$ . По-видимому, этим можно объяснить регуляцию экспрессии eotaxin под действием глюкокортикоидов, TNF- $\alpha$ , IL-4 и IFN- $\gamma$  [Garcia-Zepeda E.A., 1997; Mochizuki M., 1998; Chang H.S., 2005]. Было установлено, что эозинофилы продуцируют значительное количество eotaxin и характеризуются высокой экспрессией мРНК этого белка. Кроме того, показано, что эти процессы индуцируются IL-5 и TNF- $\alpha$ . Удивительным является тот факт, что IL-5 подавляет стимулированную TNF- $\alpha$  экспрессию eotaxin [Han S.J. et al., 1999]. Поэтому высокий уровень IL-5 в сочетании с повышенной продукцией eotaxin, вероятно, является одним из возможных молекулярных механизмов формирования гемической и тканевой эозинофилии при различных патологических процессах [Rothenberg M.E., 1999]. Продукция eotaxin эозинофильными лейкоцитами может быть опосредована влиянием IL-3, который способен избирательно индуцировать экспрессию, а также продукцию этого белка в ответ на C5a [Garcia-Zepeda E.A., 1996, 1997; Nakajima T., 1998]. Известно также, что синтез eotaxin фибробластами кожи опосредован стимуляцией IL-4 [Mochizuki M. et al., 1999].

В последнее время стало известно о существовании eotaxin-2 [Forssmann U., et al., 1997]. Это новый хемоаттрактант для эозинофилов, известный также как СК $\beta$ 6 и MPIF-2, имеющий 39% гомологии с eotaxin. Несмотря на это, оба цитокина имеют много общего, поскольку действуют

только через специфический рецептор CCR3. Как и eotaxin, eotaxin-2 является аттрактантом для базофилов и индуцирует выброс гистамина и LTC<sub>4</sub> базофилами, активированными IL-3 [Rothenberg M.E., 1999].

Следует отметить, что имеющиеся в литературе данные, касающиеся влияния eotaxin на реализацию запрограммированной гибели эозинофилов, немногочисленны. В частности, ряд исследователей показали, что при инкубации эозинофилов *in vitro* в присутствии рекомбинантных форм GM-CSF и eotaxin продолжительность жизни эозинофильных гранулоцитов увеличивалась (в среднем до 2 недель), а исключение из культуральной среды хемокина приводило к сокращению срока жизни культивируемых клеток вдвое и к увеличению фракции эозинофилов, подвергнутых апоптотической гибели. Из этого следует, что eotaxin обладает способностью потенцировать антиапоптотический эффект GM-CSF [Iversen P.O. et al., 1997; Lampinen M. et al., 2004]. Данный эффект реализуется за счет способности eotaxin увеличивать презентацию молекул активации CD69 на мембране эозинофилов [Walsh Y. et al., 1996].

В проведенном нами исследовании содержания eotaxin в сыворотке крови у пациентов с гемобластозами достоверное увеличение его концентрации регистрировалось лишь у пациентов с лимфомой Ходжкина (табл. 16). В свою очередь у пациентов с описторхозом значимое повышение концентрации eotaxin отмечалось в обеих исследуемых группах (острая и хроническая формы заболевания) (табл. 17), (рис. 9). Повышение уровня eotaxin в сыворотке крови у данных больных, по-видимому, связано со значительным увеличением количества эозинофилов в крови и их способностью самостоятельно секретировать этот хемокин.

Исследуя влияние r-eotaxin на запрограммированную гибель эозинофильных гранулоцитов у пациентов с гемобластозами, мы установили достоверное снижение (по сравнению с контролем) уровня относительного и абсолютного числа клеток, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы (табл. 18). В то же время, число аннексин-



положительных клеток при инкубации в среде с добавлением *r-eotaxin* не имело достоверных различий по сравнению с уровнем их спонтанной гибели, что говорит об отсутствии чувствительности эозинофилов к антиапоптотическим стимулам. Установленный факт, по-видимому, можно объяснить функциональной неполноценностью эозинофильных лейкоцитов вследствие увеличения митотического индекса и укорочения клеточного цикла на ранних этапах их созревания. Это приводит к появлению в кровотоке эозинофильных клеток, не достигших зрелости и не способных адекватно реагировать на про- и антиапоптотические стимулы, что ведет к нарушению реализации их запрограммированной гибели.

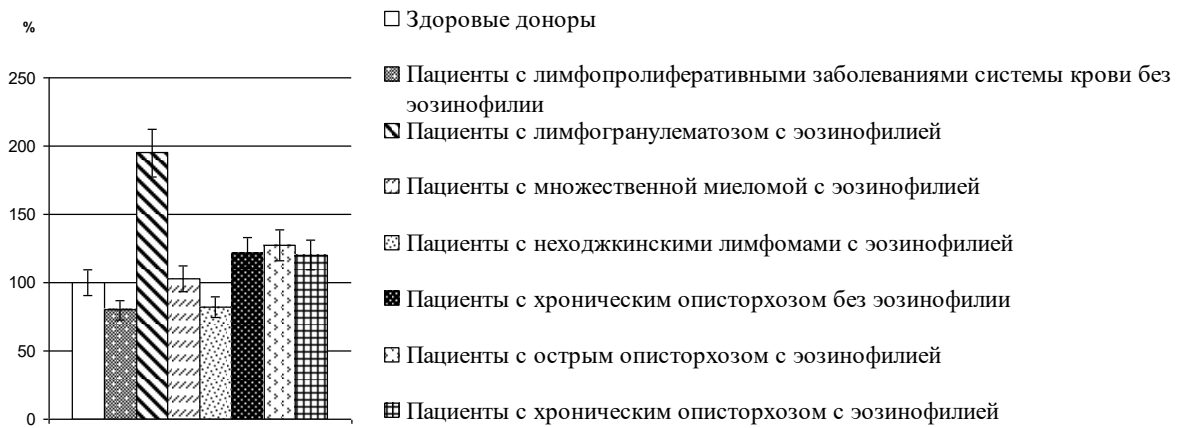


Рис. 9. Концентрация эотаксина в сыворотке крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и описторхозом, сопровождавшимися эозинофилией.

При инкубации *in vitro* эозинфильных гранулоцитов, полученных у пациентов с описторхозом, в среде с добавлением *r-eotaxin* нами зарегистрировалось снижение числа апоптотически измененных клеток по сравнению с контролем и базальным уровнем (табл. 19), что свидетельствует об угнетении *eotaxin* запрограммированной гибели эозинофилов у пациентов с острым и хроническим описторхозом, обусловленном, вероятно, повышенной экспрессией клетками рецепторов к этому хемокину.

По данным корреляционного анализа у больных лимфогранулематозом, множественной миеломой и острым описторхозом были выявлены положительные функциональные связи между содержанием эозинофилов в крови и продукцией мононуклеарными лейкоцитами медиаторов -  $IL-5$  и  $IL-3$

( $-r=0,620$ ,  $p<0,05$  и  $-r=0,520$ ,  $p<0,05$ ;  $-r=0,735$ ,  $p<0,05$  и  $-r=0,531$ ,  $p<0,05$ ;  $-r=0,779$ ,  $p<0,05$  и  $-r=0,560$ ,  $p<0,05$ , соответственно), что является подтверждением установленного цитокинопосредованного механизма формирования гемической эозинофилии при данных нозологиях. Наряду с этим у лиц, страдающих лимфомой Ходжкина и у пациентов с острым описторхозом нами были установлены позитивные связи между концентрацией eotaxin и относительным содержанием эозинофилов в крови ( $r=0,502$ ,  $p<0,05$  и  $r=0,790$ ,  $p<0,05$ ), что свидетельствует о причастности данного хемокина к развитию эозинофильной реакции крови при этих патологиях.

При проведении регрессионного анализа оказалось, что из исследуемых нами параметров (IL-3, IL-5 и eotaxin) наибольший вклад в формирование эозинофилии крови при лимфогранулематозе и остром описторхозе принадлежит IL-5 (соответственно,  $\beta=1,07$ ,  $p=0,15$  и  $\beta=1,15$ ,  $p=0,18$ ).

В ходе проведенного корреляционного анализа были обнаружены отрицательные функциональные связи между уровнем спонтанного апоптоза эозинофильных клеток и продукцией эозинофилспецифичных цитокинов (IL-3, IL-5, eotaxin) при лимфогранулематозе и остром описторхозе, свидетельствующие о причастности этих медиаторов к ингибированию программированной гибели эозинофилов при данных заболеваниях (соответственно  $-r=0,524$ ,  $p<0,05$ ;  $-r=0,701$ ,  $p<0,05$  и  $-r=0,538$ ,  $p<0,05$  – при лимфогранулематозе;  $-r=0,521$ ,  $p<0,05$ ;  $-r=0,562$ ,  $p<0,05$  и  $-r=0,556$ ,  $p<0,05$  – при остром описторхозе).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование механизмов формирования больших эозинофилий крови представляет особый интерес для медицинской науки, поскольку накопленные на сегодняшний день фундаментальные знания не позволяют создать целостного представления о патогенезе гиперэозинофилий. Вместе с тем, являясь одной из самых агрессивных эффекторных клеток, эозинофильный лейкоцит, реализует свой высокий цитотоксический потенциал в отношении клеток макроорганизма. Длительная гиперэозинофилия

сопряжена с формированием тяжелых осложнений, таких как фиброзирующий альвеолит, васкулиты, пристеночный фибропластический эндокардит, миокардит, невриты, эозинофильный гастродуоденит и др. [Абрамычев А.Н. и соавт., 1984; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Мокеева Р.А. и соавт., 2000; Озерецковская Н.Н., 2000; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Куропатенко М.В., Желенина Л.А., 2005]. В связи с этим проблема вскрытия молекулярных механизмов развития больших эозинофилий крови с целью поиска патогенетически обоснованных путей коррекции нарушений, вызванных гиперэозинофилией, в настоящее время является актуальной.

Интенсивное развитие молекулярной биологии в последние годы поставило вопрос о роли нарушения программированной гибели клеток в патогенезе различных патологических процессов. В литературе высказывается мнение о том, что нарушение или дефекты апоптоза эозинофильных гранулоцитов могут лежать в основе формирования эозинофилии крови [Druilhe A. et al., 1996; Воробьев А.И., 2002]. В проведенном нами исследовании у больных гемобластозами (лимфогранулематоз, множественная миелома, неходжкинские лимфомы) и острым описторхозом, ассоциированных с эозинофилией, было продемонстрировано снижение фракции апоптотически измененных эозинофилов по сравнению с таковой у здоровых доноров.

Как известно, апоптоз различных клеток находится под постоянным контролем ряда цитокинов. Модуляторами апоптотической гибели эозинофилов, по данным ряда авторов, являются IL-5, IL-3 и GM-CSF [Tai P.C. et al., 1991; Yamaguchi Y. et al., 1991; Simon H. et al., 1997; Simon H., Alam R., 1999]. В проведенном нами исследовании было зарегистрировано увеличение продукции мононуклеарами крови больных гемобластозами и описторхозом IL-5, IL-3, а так же возрастание в сыворотке крови обследованных пациентов уровня eotaxin, что позволило сделать вывод о вовлечении указанных медиаторов в механизмы развития синдрома эозинофилии (рис. 10).

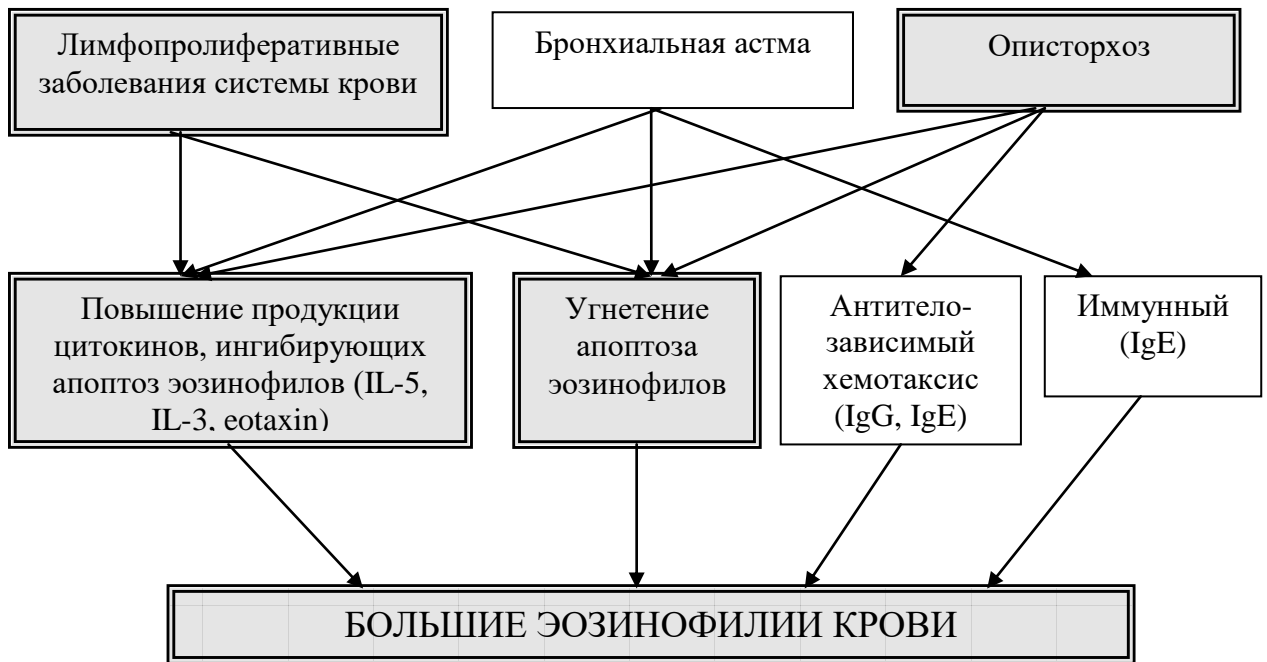


Рис. 10. Механизмы развития больших эозинофилий крови при патологических процессах разного генеза [по данным А. Druilhe et al., 1996; М. Kato et al., 1999; А.М. Vignola et al., 1999; А.С. Jang et al., 2000; И.А. Деева, 2004 и собственным данным (выделено)]

Однако нами было показано, что при дополнительном воздействии *in vitro* IL-3, IL-5 и eotaxin эозинофильные лейкоциты, выделенные из крови пациентов с лимфопролиферативными гематологическими заболеваниями (лимфогранулематоз, множественная миелома, неходжкинские лимфомы), ассоциированными с эозинофилией, отличаются нарушенной восприимчивостью к антиапоптотическому влиянию цитокинов. В свою очередь при культивировании эозинофилов, полученных у больных острым и хроническим описторхозом, с рекомбинантными формами цитокинов (IL-3, IL-5, eotaxin) было продемонстрировано увеличение численности фракции клеток, подвергнувшихся апоптотической гибели, что свидетельствует о повышении чувствительности клеток к антиапоптотическим стимулам.

Таким образом, подводя итог, следует отметить, что у обследованных нами пациентов с гемобластомами и описторхозом имеет место нарушение цитокинопосредованной программированной гибели эозинофильных

лейкоцитов, что обуславливает, наряду с другими факторами, развитие больших эозинофилий крови у данных больных (рис. 10).

Дальнейшие исследования феномена эозинофилии, на наш взгляд, должны быть направлены на детальное изучение молекулярных основ дизрегуляции программированной гибели эозинофильных лейкоцитов.

## ВЫВОДЫ

1. Механизмы развития больших эозинофилий крови при лимфопролиферативных гематологических заболеваниях (лимфогранулематоз, множественная миелома, неходжкинские лимфомы) и описторхозе связаны с угнетением апоптоза эозинофильных гранулоцитов.

2. Механизмы нарушения программированной гибели эозинофилов у больных с гиперэозинофилиями крови опосредованы повышенной продукцией IL-3, IL-5 и eotaxin.

3. При дополнительном воздействии в условиях *in vitro* рекомбинантных форм IL-3, IL-5 и eotaxin эозинофильные гранулоциты, полученные у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, характеризуются нарушением чувствительности к антиапоптотическому воздействию цитокинов.

4. При культивировании эозинофилов крови больных описторхозом с эозинофилией *in vitro* с рекомбинантными формами IL-3, IL-5 и eotaxin количество клеток, подвергшихся апоптотической гибели, снижено.

5. Несмотря на наличие общих закономерностей реализации опосредованного IL-3, IL-5 и eotaxin апоптоза эозинофилов при больших эозинофилиях крови, осложняющих течение лимфопролиферативных гематологических заболеваний и описторхоза, чувствительность эозинофильных гранулоцитов к действию цитокинов с антиапоптотической активностью различна.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдулкадыров, К.М. Клиническая гематология: Справочник / К.М. Абдулкадыров. – СПб: Питер, 2006. – 448 с.
2. Адаскевич, В.П. Эозинофильные дерматозы / В.П. Адаскевич, О.С. Зыкова // Российский журнал кожных и венерических болезней. - 1998. - № 4. - С. 22 - 28.
3. Анализ молекулярного взаимодействия в системе: IL-1 $\beta$ - IL-1RA-IL-1R / А.В. Ковальчук, Б.Н. Соболев, Л.В. Ганковская и др. // Иммунология. - 2001. - № 1. - С. 6 - 10.
4. Анаев, Э.Х. Эозинофилы и эозинофилии / Э.Х. Анаев // Пульмонология и аллергология. - 2002. - №3. - С.15-18.
5. Антонов, В.Г. Патогенез онкологических заболеваний. Цитоплазматические и молекулярно-генетические механизмы иммунной резистентности малигнизированных клеток / В.Г. Антонов, В.К. Козлов // Цитокины и воспаление. – 2004. – Т. 3, №2. – С. 23-33.
6. Апоптоз: начало будущего / А.Н. Маянский, Н.А. Маянский, М.А. Абаджиди, М.И. Заславская // Журн. микробиол. - 1997. - №2. - С.88-94.
7. Барышников, А.Ю. Программированная клеточная смерть (апоптоз) / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин // Российский онкологический журнал. – 1996. - №1. - С. 58-61.
8. Беклемишев, Н.Д. Положительные обратные связи в механизмах иммунного ответа / Н.Д. Беклемишев // Иммунология. - 1998. - № 5. - С. 15 - 20.
9. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы апоптоза / Н.Н. Белушкина, Х.Х. Али, С.Е. Северин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 1998. - №4. - С. 15 - 23.
10. Белушкина, Н.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза / Н.Н. Белушкина, С.Е. Северин // Архив патологии. - 2001. – Т. 63, №1. - С. 51 - 60.

11. Бережная, Н.М. Интерлейкины и формирование иммунологического ответа при злокачественном росте / Н.М. Бережная // Аллергология и иммунология. – 2000. – Т. 1, №1. – С. 45 - 61.
12. Бережная, Н.М. Эозинофилы, базофилы и иммуноглобулин Е в противоопухолевой защите / Н.М. Бережная, В.Ф. Чехун, Р.И. Сепиашвили // Аллергология и иммунология. – 2005. – Том 6, №1. – С. 38 - 49.
13. Биоэнергетика и смерть / Б.В. Черняк, О.Ю. Плетюшкина, Д.С. Изюмов и др. // Биохимия. – 2005. – Т.70. - №.2. - С.294-301.
14. Бойчук, С. В. Fas-рецептор и его роль при atopических заболеваниях / С. В. Бойчук, И. Г. Мустафин // Иммунология. – 2001. – №3. – С. 24-29.
15. Боровиков В. Statistica. Искусство анализа данных на компьютере / В. Боровиков. – Спб., Москва, Харьков., Минск, 2001. – 306 с.
16. Бра, М. Митохондрии в запрограммированной гибели клетки: различные механизмы гибели / М. Бра, Б. Квинан, С.А. Сузин // Биохимия. – 2005. – Т.70, №. 2. - С.284-293.
17. Васильева, Г.И. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами / Г.И. Васильева, И.А. Иванова, С.Ю. Тюкавкина // Иммунология. - 2000. - №5. - С. 11 - 16.
18. Владимирская, Е. Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия / Е. Б. Владимирская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2002. – №11. – С. 25-32.
19. Владимирская, Е. Б. Механизмы апоптотической смерти клеток / Е. Б. Владимирская // Гематология и трансфузиология. – 2002. – Т.47, №2. – С. 35-40.
20. Влияние рекомбинантного интерлейкина-5 на апоптотическую гибель эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой / И.И. Иванчук, Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов и др. // Медицинская иммунология. 2004. – Т.6, №1-2. - С.117-120.



21. Волкова, М.А. Клиническая онкогематология / М.А. Волкова. – М.: Медицина, 2001. – 572с.
22. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии: В 2т. / Под ред. А.И. Воробьева - Москва, 2002. – Т.1. - 280с.
23. Гиперэозинофильный вариант РН - положительного хронического миелолейкоза / Н.Д. Хорошко, Р.А. Мокеева, А.Г. Туркина и др. // Терапевтический архив. - 1998. - №7. - С. 29 – 37.
24. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 459с.
25. Гольдберг, Е.Д. Динамическая теория регуляции кроветворения и роль цитокинов в регуляции гемопоэза / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.В. Жданов // Медицинская иммунология. - 2001. - Т.3, №4. - С. 487 - 497.
26. Гриншпун, Л.Д. Эозинофилы и эозинофилии / Л.Д. Гриншпун, Ю.Е. Виноградова // Терапевтический архив. - 1983. - № 10. - С. 87 - 90.
27. Джальчинова, В.Б. Эозинофилы и их роль в патогенезе аллергических заболеваний / В.Б. Джальчинова, Г.М. Чистяков // Российский вестник пренатологии и педиатрии. - 1999. - № 5. - С. 42 - 45.
28. Егоров, И.В. Дифференциальная диагностика эозинофилии в сочетании с интоксикационным синдромом / И.В. Егоров, Л.Н. Котина // Клиническая медицина. – 2004. –Т.82, №8. -С. 70 - 72.
29. Ершов, Ф.И. Цитокины – новое поколение биотерапевтических препаратов/ Ф.И. Ершов // Вестник РАМН. - 2006. - №9 - 10. – С. 45 – 50.
30. Ешану, В.С. Цитокины и их биологические эффекты при некоторых болезнях печени / В.С. Ешану // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. - 2004. - №5. – С. 11 – 16.
31. Зубова, С.Г. Молекулярные механизмы действия фактора некроза опухолей  $\alpha$  и трансформирующего фактора роста  $\beta$  в процессе ответа макрофага на активацию / С.Г. Зубова, В.Б. Окулов // Иммунология. - 2001. - №5. - С. 18-22.

32. Идиопатический и симптоматический гиперэозинофильные синдромы (сравнительная характеристика на основе 14 наблюдений) / Н.Д. Хорошко, Р.А. Мокеева, А.Г. Туркина и др. // Терапевтический архив. - 1997. - №7. - С. 26 - 33.

33. Казначеев, К.С. Механизмы развития цитокининдуцированного апоптоза / К.С. Казначеев // Гематология и трансфузиология. – 1999. – Т. 44, №1. – С. 40 - 44.

34. Кадагидзе, З.Г. Цитокины / З.Г. Кадагидзе // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, №3. – С. 131 – 139.

35. Кашкин, К.Е. Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность / К.Е. Кашкин // Клиническая лабораторная диагностика. - 1998. - №11. - С. 21 - 32.

36. Кетлинский, С.А. Роль Т-хелперов 1 и 2 в регуляции клеточного и гуморального иммунитета / С.А. Кетлинский // Иммунология. - 2002. - №2. - С. 77 - 79.

37. Кетлинский, С.А. Цитокины мононуклеарных фагоцитов в регуляции реакции воспаления и иммунитета / С.А. Кетлинский, Н.М. Калинина // Иммунология. - 1995. - №3. - С. 30 - 44.

38. Коровина, Н.А. Клинические аспекты эозинофилии у детей / Н.А. Коровина, И.Н. Захарова, Л.П. Гаврюшова // Российский педиатрический журнал. – 2002. - №2. - С. 42 - 46.

39. Куропатенко, М.В. Бронхиальная астма и паразитозы у детей / М.В. Куропатенко, Л.А. Желенина // Аллергология. – 2005. - №2. – С. 28 -34.

40. Луговская, С.А. Структура и функции моноцитов и макрофагов / С.А. Луговская // Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - №9. - С. 10-15.

41. Лукьянова, Н.Ю. Роль генов p53 и bcl-2 в апоптозе и лекарственной резистентности опухолей / Н.Ю. Лукьянова, Г.И. Кулик, В.Ф. Чехун // Вопросы онкологии. – 2000. – Т.46, №2. – С. 121 – 127.

42. Мамонтова, Т.В. Новые аспекты апоптоза мононуклеарных клеток в патогенезе атопической бронхиальной астмы / Т.В. Мамонтова, И.П. Кайдашев // Аллергология. – 2005. - №4. – С. 15 – 23.

43. Маянский, Н.А. Каспазозависимый механизм апоптоза нейтрофилов: апоптогенный эффект туморонекротического фактора  $\alpha$  / Н.А. Маянский // Иммунология. – 2002. - №1. - С. 15-17.

44. Маянский, Н.А. Митохондрии нейтрофилов: особенности физиологии и значение в апоптозе / Н.А. Маянский // Иммунология. – 2004. - №5. - С. 307-312.

45. Медуницын, Н.В. Цитокины и аллергия / Н.В. Медуницын // Иммунология. - 1999. - № 5. - С. 5 - 9.

46. Межклеточные и клеточно-матриксные взаимодействия в патологии / А.А. Иванов, О.П. Гладских, А.В. Кузнецова, Т.И. Данилова // Молекулярная медицина. - 2005. - №2. - С. 16 - 21.

47. Механизмы гиперэозинофильных реакций и повреждающее действие эозинофилов / А.Н. Абрамычев, В.Г. Иванов, М.И. Алексеева и др. // Терапевтический архив. – 1984. - №6. - С. 88 - 93.

48. Минеев, В.Н. современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии. Часть I / В.Н. Минеев, Л.Н. Сорокина // Аллергология. -2005. - № 4. - С. 38 - 44.

49. Мойбенко, А.А. Ферментативные механизмы апоптоза / А.А. Мойбенко, В.Е. Досенко, В.С. Нагибин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 2005. - № 3. - С. 17-26.

50. Москалева, Е.Ю. Возможные механизмы адаптации клетки к повреждениям, индуцирующим программированную гибель: связь с патологией / Е.Ю. Москалева, С.Е. Северин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2006. - №2. – С. 2 -15.

51. Намазова, Л.С. Роль цитокинов в формировании аллергических реакций у детей / Л.С. Намазова, В.А.Ревякина, И.И. Балаболкин // Педиатрия. – 2000. - №1. - С. 56 - 65.

52. Невзорова, В.А. Апоптоз и воспаление при бронхиальной астме / В.А. Невзорова, Т.Н. Суворенко, Е.Н. Коновалова //Терапевтический архив. – 2001. - №12. – С. 92 – 96.

53. Озерецковская, Н.Н. Органная патология в острой стадии тканевых гельминтозов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E, G4 и факторов, индуцирующих иммунный ответ / Н.Н. Озерецковская // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2000. - № 3. – С. 3 – 6.

54. Озерецковская, Н.Н. Органная патология в хронической стадии тканевых гельминтозов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E, G4 и факторов, индуцирующих иммунный ответ / Н.Н. Озерецковская // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2000. - № 4. – С. 9 – 13.

55. Олейник, Е.К. Система апоптоза Fas-FasL в онкогенезе / Е.К. Олейник, М.Ю. Донников, В.М. Олейник // Иммунология. - 2004. - №4. - С.251-255.

56. Орловская, И.А. Внутриклеточные сигнальные системы в регуляции апоптоза эритроидных клеток / И.А. Орловская, В.А. Козлов, Л.Б. Топоркова // Иммунология. - 2005. - №6. - С. 312 - 315.

57. Особенности регуляции апоптоза эозинофилов при бронхиальной астме / И. А. Деев, И.И. Иванчук, А.Э. Сазонов и соавт. // Сборник научных трудов по итогам конференции «Здоровье детей – наше будущее!». – 2004. – С. 82 – 95.

58. Патология сердца при идиопатическом гиперэозинофильном синдроме / Р.А. Мокеева, Н.В. Цветаева, Е.А. Семенова и др. // Терапевтический архив. - 2000. -№12. - С. 59 - 62.

59. Потапнев, М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами / М.П. Потапнев // Иммунология. - 2002. - №4. - С. 237 – 243.
60. Потапнев, М.П. В-лимфоциты. Цитокинообразующая функция / М.П. Потапнев // Иммунология. - 1994. - №4. - С. 4 – 8.
61. Райкис, Б.Н. Современные взгляды на иммунологические механизмы формирования и течения бронхиальной астмы у взрослых / Б.Н. Райкис, М.Н. Гогугева // Аллергология. - 2006. - №3. - С. 47 – 50.
62. Роль интерлейкина-5 в механизмах апоптотической гибели эозинофилов периферической крови больных бронхиальной астмой / И.И. Иванчук, А.Э. Сазонов, Ф.И. Петровский и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2003. - №3. – С.38-43.
63. Самуилов, В.И. Программируемая клеточная смерть / В.И. Самуилов // Биохимия. - 2000. - Т.65. - №8. - С.1032 - 1041.
64. Семенкова, Е.Н. Клинические аспекты гиперэозинофилии / Е.Н. Семенкова, С.В. Моисеев, О.Г. Наместникова // Клиническая медицина. - 2004. - №2. - С. 28 - 31.
65. Симбирцев, А.С. Интерлейкин-2 и рецепторный комплекс интерлейкина-2 в регуляции иммунитета/ А.С. Симбирцев // Иммунология. - 1998. - №6. - С. 3 – 8.
66. Симбирцев, А.С. Роль цитокинов в регуляции физиологических функций иммунной системы / А.С. Симбирцев // Физиология и патология иммунной системы. – 2004. - №10. - С.3-10.
67. Симбирцев, А.С. Цитокины: классификация и биологические функции / А.С. Симбирцев // Цитокины и воспаление. - 2004. - №2. - С. 16 – 21.
68. Славина, Е.Г. Модуляция цитотоксического действия противоопухолевых лекарств *in vitro* интерфероном: связь с гиперэкспрессией генов *mdr-1* и *bcl-2* / Славина Е.Г. // Аллергол. и иммунол. – 2000. – Т.1, № 2. – С. 170-171.

69. Структурно-функциональная характеристика и роль эозинофилов в патогенезе и лечении бронхиальной астмы / Э.Х. Анаев, А.Л. Черняев, А.Р. Татарский, Л.М. Воронина // Пульмонология. – 1994. - №4. - С. 82 - 85.
70. Суханова, Г.А. Апоптоз. Учебное пособие / Г.А. Суханова, О.Е. Акбашева. – Томск: Изд-во ТПУ, 2006. – 172 с.
71. Сфинголипиды и клеточная сигнализация: участие в апоптозе и атерогенезе / О.М. Ипатова, Т.И. Торховская, Т.С. Захарова, Э.М. Халилов // Биохимия. - 2006. - Т.71. - №7. - С.882 - 893.
72. Тотолян, А.А. Роль хемокинов и их рецепторов в иммунорегуляции / А.А. Тотолян // Иммунология. - 2001. - №5. - С. 7 - 10.
73. Трапезников, Н.Н. Справочник по онкологии / Н.Н. Трапезников, И.В. Поддубная, Т.И. Артамонов. - М: Каппа, 1996. - 624 с.
74. Тяжелова, В.Г. TRAIL- и WNT-сигнальные пути в апоптозе / В.Г. Тяжелова // Иммунология. - 2005. - №6. - С. 377 - 384.
75. Уманский, С.Р. Апоптоз: молекулярные и клеточные механизмы / С.Р. Уманский // Молекулярная биология. - 1996. - Т.30. -№3. - С.487-498.
76. Утешев, Д.Б. Апоптоз: фармакологические аспекты / Д.Б. Утешев, А.В. Сергеев, Б.С. Утешев // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т.61. - №4. - С.57-65.
77. Фассахов, Р.С. Роль эозинофилов при бронхиальной астме / Р.С. Фассахов, С.В. Бойчук, И.М. Рахматуллин // Терапевтический архив. – 1992. - №1. - С.147 - 151.
78. Физиологическая (запрограммированная) гибель клеток при гемопоэзе / Г.И. Козинец, В.М. Погорелов, Г.М. Хазем и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 1996. - №1. - С. 35-38.
79. Фильченков, А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций / А.А. Фильченков // Биохимия. – 2003. – Т.68, №4. - С.453-466.
80. Фрейдлин, И. С. Ключевая позиция макрофагов в цитокиновой регуляторной цепи // Иммунология. – 1995. - №3. – С. 44 – 48.

81. Фрейдлин, И.С. Паракринные и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // И.С. Фрейдлин / Иммунология. - 2001. - №5. - С. 4 - 7.
82. Хаитов, Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 431с.
83. Царегородцева, Т.М. Цитокины в гастроэнтерологии / Т.М. Царегородцева, Т.И. Серова. - М.: Анахарсис, 2003. - 96с.
84. Чучалин, А.Г. Гиперэозинофилия при заболеваниях органов дыхания / А.Г. Чучалин // Терапевтический архив. - 2003. - №3. - С. 5 - 15.
85. Ярилин, А.А. Апоптоз и его место в иммунных процессах / А.А. Ярилин // Иммунология. - 1996. - №6. - С.10-21.
86. Ярилин, А.А. Апоптоз. Природа феномена и его роль в целостном организме / А.А. Ярилин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. - 1998. - №2. - С. 38-48.
87. A case of T-cell lymphoma accompanying marked eosinophilia, chronic eosinophilic pneumonia and eosinophilic pleural effusion. A case report. / A. Kawasaki, Y. Mizushima, S. Matsui et al. // Tumori. - 1991. - Vol. 77. - P. 527-530.
88. Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P<sub>2</sub> and PtdIns-3,4,5-P<sub>3</sub> / A. Toker, M. Meyer, K.K. Reddy et al. // J. Biol. Chem. - 1994. - Vol. 269. - P. 32358-32367.
89. Activation of p38 MAP kinase pathway by erythropoietin and interleukin-3 / Y. Nagata, T. Moriguchi, E. Nishida, K. Todokoro // Blood. - 1997. - Vol. 90. - P. 929-934.
90. Activation of the Fas receptor on lung eosinophils leads to apoptosis and the resolution of eosinophilic inflammation of the airways / S. Tsuyuki, C. Bertrand, F. Erard et al. // J. Clin. Invest. - 1995. - Vol. 96. - P. 2924.
91. Activation of the STAT3/acute phase response factor transcription factor by interleukin-5 / E. Caldenhoven, T. van Dijk, J. A. Raaijmakers et al. // J. Biol. Chem. - 1995. - Vol. 270. - P. 25778-25784.

92. Adachi, T. The mechanism of IL-5 signal transduction / T. Adachi, R. Alam // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* – 1998. – Vol. 275. – P. 623-633.
93. Agrawal, D.K. PAF receptors and G-proteins in human blood eosinophils and neutrophils / D.K. Agrawal, N. Ali, T. Numao // *J. Lipid. Mediat.* – 1992. - №5. – P. 101-104
94. Alam, R. The interleukin-5/receptor interaction activates Lyn and Jak2 tyrosine kinases and propagates signals via the Ras-Raf-1-MAP kinase and the Jak-STAT pathways in eosinophils / R. Alam, K. Pazdrak, S. Stafford, P. Forsythe // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1995. – Vol. 107. – P. 226-227.
95. Alam, R. The p38 MAP kinase and myosin light chain kinase (MLCK) critically regulate eosinophil chemotaxis in response to eotaxin / R. Alam, S. Stafford, G. Kamper // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1999. – Vol. 103. - №1. – P. 56-58.
96. Anderson, S.M. Activation of src-related tyrosine kinases by IL-3 / S.M. Anderson, B. Jorgensen // *J. Immunol.* – 1995. – Vol. 155. – P. 1660-1670.
97. Analysis of signal transduction pathways in human eosinophils activated by chemoattractants and the T-helper 2-derived cytokines interleukin-4 and interleukin-5 / P.J. Coffey, R.C. Schweizer, G.R. Dubois et al. // *Blood.* - 1998. – Vol. 91. – P. 2547-2557.
98. Analysis of the survival of mature human eosinophils: interleukin-5 prevents apoptosis in mature human eosinophils / Y. Yamaguchi, T. Suda, S. Ohta et al. // *Blood.* - 1991. - Vol. - 78, № 3. – P. 2542 - 2547.
99. An induced proximity model for caspase-8 activation / M. Muzio, B.R. Stockwell, H.R. Stennicke et al. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 2926.
100. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain / M.P. Boldin, E.E. Varfolomeev, Z. Panczer et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 7795.
101. Antiapoptotic signals of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor are transduced via Jak2 tyrosine kinase in eosinophils / H.U. Simon, S. Yousefi, B. Dibbert et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – Vol. 27. – P. 3536.



102. Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin / P.A. Abello, S.F. Fidler, G.B. Bulkley, T.G. Buchman // Arch. Surg. – 1994. – Vol. 129. – P. 134.

103. Arai, K.I. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses / K.I. Arai, F. Lee, A. Miyajima // Annu. Rev. Biochem. – 1990. – Vol. 59. – P. 783-836.

104. A single nucleotide polymorphism on the promoter of eotaxin1 associates with its mRNA expression and asthma phenotypes / H.S. Chang, J.S. Kim, J.H. Lee et al. // J. Immunol. - 2005. – Vol. 174. - P. 1525-1531.

105. Association between Lyn protein tyrosine kinase (p53/56lyn) and the  $\beta$  subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptors in a GM-CSF-dependent human megakaryocytic leukemia cell line (M-07e) / Y. Li, B.F. Shen, C. Karanes et al. // J. Immunol. – 1995. – Vol. 154. – P. 2165-2174.

106. Autocrine growth of CD4<sup>+</sup> T cells. Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells / L.A. Greenbaum, J.B. Horowitz, A. Woods et al. // J. Immunol. – 1988. – Vol. 140. – P. 1555-1560.

107. Barnes, P.J. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines / P.J. Barnes // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 170, №8. - P. 5359 - 5366.

108. Bates, M.E. IL-5 activates a 45-kilodalton mitogen-activated protein (MAP) kinase and Jak-2 tyrosine kinase in human eosinophils / M.E. Bates, P.J. Bertics, W.W. Busse // J. Immunol. – 1996. – Vol. 156. – P. 711-718.

109. Bcl-2 expression in sputum eosinophils in patients with acute asthma / A.S. Jang, I.S. Choi, S. Lee et al. // Thorax. – 2000. – Vol. 55. - №5. – P. 370-374.

110. Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death / L.H. Boise, M. Gonzalez Garcia, C.E. Postema et al. // Cell. – 1993. – Vol. 74. P. 597-608.

111. Billiau, A. Interferon-gamma: mechanism of action and therapeutic potential / A. Billiau, R. Dijkmans // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 40. – P. 1433-1439.

112. Broide, D.H. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics / D.H. Broide, M.M. Paine, G.S. Firestein // *J. Clin. Invest.* – 1992. – Vol. 90. – P. 1414-1424.

113. Brown, J.R. Kinetics of eotaxin expression and its relationship to eosinophil accumulation and activation in bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage (BAL) of asthmatic patients after allergen inhalation / J.R. Brown, J. Kleimberg, M. Marini // *Clin. Exp. Immunol.* – 1998. – Vol. 114. – P. 137-146.

114. Buttke, T.M. Oxidative stress as a mediator of apoptosis / T.M. Buttke, P.A. Sandstrom // *Immunol. Today.* – 1994. – Vol. 15. – P. 7.

115. Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex / K. Cain, D.G. Brown, C. Langlais, G.M. Cohen // *J. Biol. Chem.* – 1999. – Vol. 274. – P. 22686-22692.

116. CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentration of interleukin-5: effect of glucocorticoid therapy / C.J. Corrigan, A. Haczku, V. Gemon-Engesaeth et al. // *Am. Rev. Respir. Dis.* - 1993. – Vol. 147. – P. 540-547.

117. Characterization of the high-affinity cell-surface receptor for murine B-cell-stimulating factor 1 / L.S. Park, D. Friend, K. Grabstein et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1987. – Vol. 84. – P. 1669-1673.

118. Characterization of the human B cell stimulatory factor 1 receptor / L.S. Park, D. Friend, H.M. Sassenfeld et al. // *J. Exp. Med.* – 1987. – Vol. 166. – P. 476-488.

119. Chemokine receptor usage by human eosinophils. The importance of CCR3 demonstrated using an antagonistic monoclonal antibody / H. Heath, S.X. Qin, P. Rao et al. // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol. 99, №9. – P. 178-184

120. Chihara, J. Characterization of a receptor for interleukin 5 on human eosinophils: Variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor / J. Chihara, J. Plumas, V. Gruart et al. // *J. Exp. Med.* – 1990. – Vol. – 172. - P. 1347-1351.

121. Chung, K.F. Cytokines in asthma / K.F. Chung, P.J. Barnes // *Thorax.* - 1999. – Vol. 54. – P. 825-857.

122. Chusid, M.J. The hypereosinophilic syndrome: analysis of fourteen cases with review of literature / M.J. Chusid, D.C. Dale, B.C. West // *Medicine.* – 1975. – Vol. 54. – P. 1-27.

123. Clement, M.-V. Superoxide anion is a natural inhibitor of Fas-mediated cell death / M.-V. Clement, I. Stamenkovic // *EMBO J.* - 1996. - Vol. 15. – P. 216.

124. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in response to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis / F.W. Quelle, K. Shimoda, W. Thierfelder et al. // *Mol. Cell. Biol.* - 1995. – Vol. 15. – P. 3336-3343.

125. Contribution of Eotaxin-1 to Eosinophil Chemotactic Activity of Moderate and Severe Asthmatic Sputum / G. Dent, C. Hadjicharalambous, T. Yoshikawa et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2004. - Vol. 169. - P. 1110-1117.

126. Cohen, G.M. Caspases: The executioners of apoptosis / G.M. Cohen // *Biochem. J.* – 1997. – Vol. 326. – P. 1-8.

127. Cooperation between interleukin-5 and the chemokine eotaxin to induce eosinophil accumulation in vivo / P.D. Collins, S. Marleau, D.A. Griffiths-Johnson et al. // *J. Exp. Med.* – 1995. – Vol. 182, №5. – P. 1169-1174.

128. Critical role of Lyn kinase in inhibition of neutrophil apoptosis by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / S. Wei, J.H. Liu, P.K. Epling-Burnette et al. // *J. Immunol.* - 1996. – Vol. 157. P. 5155–5162.

129. Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade / P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo et al. // *Cell.* – 1997. – Vol. 91. – P. 479-489.

130. Dewson, G. Interleukin-5 inhibits translocation of Bax to the mitochondria, cytochrome *c* release, and activation of caspases in human eosinophils / G. Dewson, G.M. Cohen, A.J. Wardlaw // *Blood*. – 2001. - Vol. 98. - №7. – P. 2239-2247.

131. Differential activation of functionally distinct STAT5 proteins by IL-5 and GM-CSF during eosinophil and neutrophil differentiation from human CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells / E. Caldenhoven, T.B. van Dijk, A. Tijmensen et al. // *Stem Cells*. – 1998. – Vol. 16. – P. 397-403.

132. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor  $\alpha$ -chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor- $\alpha$  expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor- $\alpha$  expression / B. Gregory, A. Kirchem, S. Phipps et al. // *J. Immunol.* – 2003. – Vol.170, №4. – P. 5359-5366.

133. Different serum soluble Fas levels in patients with allergic rhinitis and bronchial asthma / M. Kato, Y. Nozaki, T. Yoshimoto et al. // *Allergy*. – 1999. – Vol.54, №12. – P. 1299-1302.

134. Direct demonstration of delayed eosinophil apoptosis as a mechanism causing tissue eosinophilia / H. Simon, S. Yousefi, C. Schranz et al. // *J. Immunol.* – 1997. – Vol. 158. – P. 3902.

135. Distinctive cationic proteins of the human eosinophil granule: Major basic protein, eosinophil cationic protein, and eosinophil-derived neurotoxin / S.J. Ackerman, D.A. Loegering, P. Venge et al. // *J. Immunol.* – 1983. – Vol. 131. – P. 2977-2982.

136. Dorsch, M. Tyrosine phosphorylation of Shc is induced by IL-3, IL-5 and GM-CSF / M. Dorsch, H. Hock, T. Diamantstein // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1994. – Vol. 200. – P. 562-568.

137. Druilhe, A. Eosinophil apoptosis in asthma / A. Druilhe, S. Letuve, M. Pretolani // *Pathol. Biol.* – 2000. – Vol. 48. - №6. – P. 566-573.

138. Dvorak, A.M. Ultrastructural analysis of human eosinophils / A.M. Dvorak, P.F. Weller // *Chem. Immunol.* – 2000. - Vol. 76, №5. – P. 1 - 28.

139. Effect of murine recombinant interleukin-5 on the cell population in guinea-pig airways / T. Iwama, H. Nagai, H. Suda et al. // *Br. J. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 105. – P. 19-22.

140. Effects of T-helper 2-type cytokines, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-5, and IL-6 on the survival of cultured human mast cells / M. Yanagida, H. Fukamachi, K. Ohgami et al. // *Blood.* – 1995. - Vol. 86. - №10. – P. 3705-3714.

141. Ember, J.A. Complement factors and their receptors / J.A. Ember, T.E. Hugli // *Immunopharmacology.* – 1997. – Vol. 38. – P. 3-15.

142. Eosinophil Apoptosis Is Mediated by Stimulators of Cellular Oxidative Metabolisms and Inhibited by Antioxidants: Involvement of a Thiol-Sensitive Redox Regulation in Eosinophil Cell Death / B. Wedi, J. Straede, B. Wieland, A. Kapp // *Blood.* – 1999. - Vol. 94. - №7. – P. 2365-2373.

143. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases / G.T. Kampen, S. Stafford, T. Adachi et al. // *Blood.* – 2000. - Vol. 95. - №6. – P. 1911-1917

144. Eotaxin mRNA expression in chronic sinusitis and allergen-induced nasal responses in seasonal allergic rhinitis / E. Minshall, L. Cameron, F. Levigne et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 1997. – Vol. 17. – P. 683-690.

145. Estaquier, J. A Role for T-Helper Type-1 and Type-2 Cytokines in the Regulation of Human Monocyte Apoptosis / J. Estaquier, C. Ameisen // *Blood.* – 1997. - Vol. 90. - №4. – P. 1618-1625.

146. Evaluation of apoptosis of eosiniphils, macrophages and T lymphocytes in mycosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis / A.M. Vignola, P. Chanez, G. Chiappara et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 1999. – Vol. 103. - №4. – P. 563-573.

147. Expression and function of the Fas receptor on human blood and tissue eosinophils / H. Hebestreit, S. Yousefi, I. Balatti et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1996. – Vol. 26. – P. 1775.

148. Fas transduces activation signals in normal human T-lymphocytes / M.R. Alderson, R.J. Armitage, E. Maraskovsky et al. // *J. Exp. Med.* – 1993. – Vol. 178. – P. 2231.

149. Fas-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway / E. Gulbins, R. Bissonnette, A. Mahboubi et al. // *Immunity.* – 1995. - №2. – P. 341.

150. Fas-mediated apoptosis in cultured human eosinophils / A. Druilhe, Z. Cai, S. Haile et al. // *Blood.* – 1996. – Vol. 87. – P. 2822

151. Favre, C. Interleukin 4 has basophilic and eosinophilic cells growth-promoting activity on cord blood cells / C. Favre, S. Saeland, C. Caux // *Blood.* – 1990 – Vol. 75. – P. 67-73.

152. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex / M. Muzio, A.M. Chinnaiyan, F.C. Kischkel et al. // *Cell.* – 1996. – Vol. 85. – P. 817.

153. Foltz, I.N. Activation of the stressactivated protein kinases by multiple hematopoietic growth factors with the exception of interleukin-4 / I.N. Foltz, J.W. Schrader // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. – P. 3092-3096.

154. Forssmann, U. Eotaxin-2, a novel CC chemokine that is selective for the chemokine receptor CCR3, and acts like eotaxin on human eosinophil and basophil leukocytes / U. Forssmann, M. Ugucioni, P. Loetscher // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 185. – P. 2171-2176.

155. Gajewski, T.F. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence / T.F. Gajewski, C.B. Thompson. // *Cell.* – 1996. – Vol. 87. – P. 589-592.

156. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells / G. Le Gros, S.Z. Ben-Sasson, R.A. Seder et al. // *J. Exp. Med.* – 1990. – Vol. 172. – P. 921-929.

157. Genomic organization, complete sequence, and chromosomal location of the gene for human eotaxin (SCYA11), an eosinophil-specific CC chemokine /

E.A. Garcia-Zepeda, M.E. Rothenberg, S. Weremowicz et al. // *Genomics*. - 1997. – Vol. 41. – P. 471-476.

158. Giembycz, M.A. Pharmacology of the Eosinophil / M.A. Giembycz, M.A. Lindsay // *Pharmacol. Rev.* – 1999. - Vol.51, №4. - P. 213-340.

159. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates microtubule-associated protein 2 kinase in neutrophils via a tyrosine kinase-dependent pathway / M.A. Raines, D.W. Golde, M. Daeipour, A.E. Nel. // *Blood*. – 1992. – Vol. 79. – P. 3350-3354.

160. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase / K. Okuda, J.S. Sanghera, S.L. Pelech et al. // *Blood*. – 1992. – Vol. 79. – P. 2880-2887.

161. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates both association and activation of phosphoinositide 3OH-kinase and src-related tyrosine kinase(s) in human myeloid derived cells / S. Corey, A. Eguinoa, K. Puyana-Theall et al. // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 2681-2690.

162. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates Jak2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes / M.F. Brizzi, M.G. Aronica, A. Rosso et al. // *J. Biol. Chem.* - 1996. – Vol. 271. – P. 3562-3567.

163. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates Jak2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes / M.F. Brizzi, M.G. Aronica, A. Rosso et al. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 3562-3567.

164. Henderson, W.R. Eosinophil peroxidase-mediated inactivation of leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, and D<sub>4</sub> / W.R. Henderson, A. Jorg, S.J. Klebanoff // *J. Immunol.* – 1982. – Vol. 128. – P. 2609-2613.

165. High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia / T. Karakas, U. Maurer, E. Weidman // *Ann. Oncol.* – 1998. - №9. – P. 159-165.

166. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy / L. Campos, J.P. Rouault, O. Sabido et al. // *Blood*. – 1993. – Vol. 81. – P. 3091-3096.

167. Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil factor / Y. Yamaguchi, Y. Hayashi, Y. Sugama et al. // *J. Exp. Med.* – 1988. – Vol. 167. – P. 1737-1740.

168. Hsu, H. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation / H. Hsu, J. Xiong, D.V. Goeddel // *Cell*. – 1995. – Vol. 81. – P. 495-504.

169. Huang, H.-M. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways / H.-M. Huang, C.-J. Huang, J.J.-Y. Yen // *Blood*. – 2000. - Vol. 96. - №5. - P. 1764-1771.

170. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia / E.A. Garcia-Zepeda, M.E. Rothenberg, R.T. Ownbey et al. // *Nat. Med.* - 1996. – Vol. 2, №8. – P. 449-456.

171. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils / J. Elsner, R. Hochstetter, D. Kimmig, A. Kapp // *Eur. J. Immunol.* - 1996. - Vol. 26, №9. – P. 1919 - 1925.

172. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions / M. Los, W. Droge, K. Stricker et al. // *Eur. J. Immunol.* – 1995. – Vol. 25. – P. 159

173. Hypereosinophilic syndrome in Hodgkin's disease with increased granulocyte-macrophage colony-stimulating factor / M. Endo, K. Usuki, K. Kitazume et al. // *Ann. Hematol.* – 1995. - Vol. 71. – P. 313-314.

174. IL-5 but not interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) inhibits eosinophil apoptosis by up-regulation of bcl-2 expression / K. Ochiai, M. Kagami, R. Matsumura, H. Tomioka // *Clin. Exp. Immunol.* – 1997. – Vol. 107. - P. 198-204.



175. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors / S.L. Swain, A.D. Weinberg, M. English et al. // *J. Immunol.* – 1990. – Vol. 145. – P. 3796-3806.

176. IL-4 induces eotaxin: a possible mechanism of selective eosinophil recruitment in helminth infection and atopy / M. Mochizuki, J. Bartels, A.I. Mallet et al. // *J. Immunol.* - 1998. – Vol. 160. P. 60-68.

177. IL-4 induces eotaxin in human dermal fibroblasts / M. Mochizuki, J. Schroder, E. Christophers et al. // *Int. Arch. Allergy Immunol.* – 1999. – Vol. 12. - №2. – P. 19 - 23.

178. IL-5 receptor-mediated tyrosine phosphorylation of SH2/SH3-containing proteins and activation of Bruton's tyrosine and Janus 2 kinases / S. Sato, T. Katagiri, S. Takaki et al. // *J. Exp. Med.* – 1994. – Vol. 180. – P. 2101-2111.

179. Imani, F. Interleukin-4 (IL-4) induces phosphatidylinositol 3-kinase (p85) dephosphorylation. Implications for the role of SHP-1 in the IL-4-induced signals in human B cells / Imani F., Rager K.J., Catipovic B. // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272. P. 7927-7931.

180. In bone marrow derived Baf-3 cells, inhibition of apoptosis by IL-3 is mediated by two independent pathways / Y. Leverrier, J. Thomas, G.R. Perkins et al. // *Oncogene.* – 1997. – Vol. 14. – P. 425-430.

181. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro / K. Matsumoto, R.P. Schleimer, H. Saito et al. // *Blood.* – 1995. – Vol. 86. – P. 1437.

182. Interleukin (IL)-3 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not IL-4, induce tyrosine phosphorylation, activation, and association of SHPTP2 with Grb2 and phosphatidylinositol 3'-kinase / M.J. Welham, U. Dechert, K.B. Leslie et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 23764-23768.

183. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs / A.L. Mui, H. Wakao, A.M. O'Farrell et al. // *EMBO J.* – 1995. – Vol. 14. – P. 1166-1175.

184. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt / L. Del Peso, M. Gonzalez-Garcia, C. Page et al. // *Science*. - 1997. - Vol. 278. - P. 687-689.

185. Interleukin (IL)-5 downregulates tumor necrosis factor (TNF)-induced eotaxin messenger RNA (mRNA) expression in eosinophils: induction of eotaxin mRNA by TNF and IL-5 in eosinophils / S.J. Han, J.H. Kim, Y.J. Noh et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 21. - P. 303-310.

186. Interleukin-5 signaling in human eosinophils involves JAK2 tyrosine kinase and Stat1 alpha / T. van der Bruggen, E. Caldenhoven, D. Kanters et al. // *Blood*. - 1995. - Vol. 85. - P. 1442-1448.

187. Interleukin-5 messenger RNA and immunoreactive protein expression by activated eosinophils in lesional atopic dermatitis skin / Y. Tanaka, E. Delaporte, S. Dubucquoi et al. // *J. Invest. Dermatol.* - 1994. - Vol. 103. - P. 589-592.

188. Intracellular localization and release of eotaxin from normal eosinophils / T. Nakajima, H. Yamada, M. Iikura et al. // *FEBS Lett.* - 1998. - Vol. 434. - P. 226-230.

189. *In vivo* expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils / K. Nishikawa, T. Morii, H. Ako et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 1992. - Vol. 90. - P. 169-174.

190. JAK2 and JAK1 Constitutively Associate With an Interleukin-5 (IL-5) Receptor  $\alpha$  and  $\beta_c$  Subunit, Respectively, and Are Activated Upon IL-5 Stimulation / N. Ogata, T. Kouro, A. Yamada et al. // *Blood*. - 1998. - Vol. 91. - №7. - P. 2264-2271.

191. Jantz, M.A. Corticosteroids in Acute Respiratory Failure / M.A. Jantz, S.A. Sahn // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 1999. - Vol. 160. - №4. - P. 1079-1100.

192. Jucker, M. Identification of a new adapter protein that may link the common  $\beta$  subunit of the receptor for granulocyte/macrophage colony-stimulating

factor, interleukin (IL)-3, and IL-5 to phosphatidylinositol 3-kinase / M. Jucker, R.A. Feldman // J. Biol. Chem. – 1995. – Vol. 270. – P. 27817-27822.

193. Kinetics of eotaxin generation and its relationship to eosinophil accumulation in allergic airways disease: Analysis in a guinea pig model *in vivo* / A.A. Humbles, D.M. Conroy, S. Marleau et al. // J. Exp. Med. -1997. Vol. 86. – P. 601-612

194. Koike, M. IL-5 and its receptor: which role do they play in the immune response? / M. Koike, K. Takatsu // Int. Arch. Allergy. Immunol. - 1994. – Vol. 104. – P. 1-9.

195. Kondo, M. Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4 / M. Kondo, T. Takeshita, N. Ishii // Science. – 1993. – Vol. 262. – P. 1874-1877.

196. Kroemer, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis / G. Kroemer // Nat. Med. – 1997. – Vol. 3. – P. 614-620.

197. Lamas, A.M. Human endothelial cells prolong eosinophil survival: regulation by cytokines and glucocorticosteroids / A.M. Lamas, G.V. Marcotte, R.P. Schleimer // J. Immunol. - 1989. – Vol. 142. – P. 3978-3984.

198. Lampinen, M. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease / M. Lampinen, M. Carlson, L.D. Hakansson // Allergy. - 2004. - Vol. 59, №8. - P. 425 - 430.

199. Lopez, A.F. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function / A.F. Lopez, C.J. Sanderson, J.R. Gamble // J. Exp. Med. – 1988. – Vol. 167. – P. 219-224.

200. Lotem, J. Cytokine control of developmental programs in normal hematopoiesis and leukemia / J. Lotem, L. Sachs // Oncogene. – 2002. - №21. – P. 3284 – 3294.

201. Lyn, Jak2, and Raf-1 kinases are critical for the antiapoptotic effect of interleukin 5, whereas only Raf-1 kinase is essential for eosinophil activation and degranulation / K. Pazdrak, B. Olszewska-Pazdrak, S. Stafford et al. // J. Exp. Med. – 1998. – Vol. 188. P. 421-429.

202. Mangan, D. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and IL-1 $\beta$  prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes / D. Mangan, G. Welch, S. Wahl // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 146. – P. 1541.

203. Mangan, D. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines / D. Mangan, S. Wahl // *J. Immunol.* – 1991. – Vol. 147. P. 3408.

204. Mattoli, S. Eotaxin expression and eosinophilic inflammation in asthma / S. Mattoli, M.A. Stacey, G. Sun // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1997. – Vol. 236. – P. 299-301.

205. McEwen, B.J. Eosinophils: A review / B.J. McEwen // *Vet. Res. Commun.* - 1992. – Vol. 16. – P. 11-44.

206. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: The role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase / R.T. Palframan, P.D. Collins, N.J. Severs et al. // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 188. – P. 1621-1632.

207. Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways / A. Klippel, C. Reinhard, W.M. Kavanaugh et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – Vol. 16. – P. 4117-4127.

208. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products / F. Colotta, F. Re, N. Polentarutti et al. // *Blood.* – 1992. - Vol. 80. - №8. – P. 2012-2020.

209. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils / P.D. Ponath, S. Qin, T.W. Post et al. // *J. Exp. Med.* - 1996. – Vol. 183. – P. 2437.

210. Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor / Y. Boie, N. Sawyer, D.M. Slipetz et al. // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 18910-18916

211. Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor Fc $\epsilon$ RII/CD23 expressed by human eosinophils / S.G. Abdelilah, L. Bouchaib, M. Morita et al. // *Int. Immunol.* - 1998. – Vol. 10. – P. 395-404.

212. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3 / M. Kitaura, T. Nakajima, T. Imai et al. // *J. Biol. Chem.* - 1996. – Vol. 271. – P. 7725.

213. Muegge, K. Interleukin-1 costimulatory activity on the interleukin-2 promoter via AP-1 / K. Muegge, T.M. Williams, J. Kant // *Science.* - 1989. – Vol. 246. – P. 249-251.

214. Multiple cytokines activate phosphatidylinositol 3-kinase in hematopoietic cells. Association of the enzyme with various tyrosine-phosphorylated proteins / M.R. Gold, V. Duronio, S.P. Saxena et al. // *J. Biol. Chem.* - 1994. – Vol. 269. – P. 5403-5412.

215. Multiple cytokines induce the tyrosine phosphorylation of Shc and its association with Grb2 in hemopoietic cells / R.L. Cutler, L. Liu, J.E. Damen, G. Krystal // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 21463-21465.

216. Multiple hemopoietic growth factors stimulate activation of mitogen-activated protein kinase family members / M.J. Welham, V. Duronio, J.S. Sanghera et al. // *J. Immunol.* – 1992. – Vol. 149. – P. 1683-1693.

217. Murdoch, C. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases / C. Murdoch, A. Finn // *Blood.* – 2000. - Vol. 95, №10. – P. 3032-3043.

218. Muzio, M. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens / M. Muzio, G.S. Salvesen, V.M. Dixit // *J. Biol. Chem.* - 1997. – Vol. 272. – P. 2952.

219. Nagata, S. The Fas death factor / S. Nagata, P. Golstein // *Science.* – 1995. – Vol. 267. – P. 1449-1456.

220. Nagata, Y. Activation of JNK signaling pathway by erythropoietin, thrombopoietin, and interleukin-3 / Y. Nagata, E. Nishida, K. Todokoro // *Blood.* – 1997. – Vol. 89. P. 2664-2669.

221. Nagata, Y. Interleukin 3 activates not only JAK2 and STAT5, but also Tyk2, STAT1, and STAT3 / Y. Nagata, K. Todokoro // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1996. – Vol. 221. – P. 785-789.

222. Nakanishi, H. Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate / H. Nakanishi, K.A. Brewer, J.H. Exton // *J. Biol. Chem.* – 1993. – Vol. 268. – P. 13-16.

223. Ohara, J. Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage / J. Ohara, W.E. Paul // *Nature.* - 1987. – Vol. 325. - P. 537-540.

224. Oxidation of bromide by the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. Formation of bromamines / E.L. Thomas, P.M. Bozeman, M.M. Jefferson, C.C. King // *J. Biol. Chem.* – 1995. – Vol. 270. – P. 2906-2913.

225. Palframan, R.T. Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase / R.T. Palframan, P.D. Collins, N.J. Severs // *J. Exp. Med.* – 1998. – Vol. 188. – P. 1621-1632.

226. Paul, W.E. Lymphocyte responses and cytokines / W.E. Paul, R.A. Seder // *Cell.* – 1994. – Vol. 76. – P. 241.

227. Pazdrak, K. Src Homology 2 Protein Tyrosine Phosphatase (SHPTP2)/Src Homology 2 Phosphatase 2 (SHP2) Tyrosine Phosphatase Is a positive regulator of the Interleukin 5 receptor signal transduction pathways leading to the prolongation of eosinophil survival / K. Pazdrak, T. Adachi, R. Alam // *J. Exp. Med.* – 1997. – Vol. 186. - № 4. – P. 561-568.

228. Perkins, G.R. The role of MAP kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation / G.R. Perkins, C.J. Marshall, M.K.L. Collins // *Blood.* - 1996. – Vol. 87. – P. 3669-3675.

229. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of

programmed cell death / M.A. Brach, S. deVos, H.J. Gruss, F. Herrmann // *Blood*. - 1992. – Vol. 80. – P. 2920–2924.

230. Prostaglandin D<sub>2</sub> causes accumulation of eosinophils in the lumen of the dog trachea / D.L. Emery, T.D. Djokic, P.D. Graf, J.A. Nadel // *J. Appl. Physiol.* – 1989. – Vol. 67. – P. 959-962.

231. Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils / S. Yousefi, D.R. Green, K. Blaser, H.U. Simon // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1994. – Vol. 91. – P. 10868-10872.

232. Receptors for Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Interleukin-3 and Interleukin-5 / A. Miyajima, A. Mui, T. Ogorochi, K. Sakamaki // *Blood*. – 1993. – Vol. 82. - №7. – P. 1960-1974.

233. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function / A.F. Lopez, C.J. Sanderson, J.R. Gamble et al. // *J. Exp. Med.* – 1988. – Vol. 167. – P. 219-224.

234. Reduced eosinophil apoptosis in induced sputum correlates with asthma severity / C.J. Duncan, A. Lawrie, M.G. Blaylock et al. // *Eur. Respir. J.* – 2003. – Vol. 22. – P. 484-490.

235. Regulation of Bcl-2 expression by oncogene Ras protein in hemopoietic cells / T. Kinoshita, T. Yokota, K. Arai, A. Miyajima // *Oncogene*. – 1995. – Vol. 10. – P. 2207-2212.

236. Requirement of Lyn and Syk tyrosine kinases for the prevention of apoptosis by cytokines in human eosinophils / S. Yousefi, D.C. Hoessli, K. Blaser et al. // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 183. – P. 1407-1414.

237. Role for Bcl-x<sub>L</sub> in Delayed Eosinophil Apoptosis Mediated by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interleukin-5 / B. Dibbert, I. Daigle, D. Braun et al. // *Blood*. – 1998. - Vol. 92. - №3. - P. 778-783

238. Role for Tyrosine Phosphorylation and Lyn Tyrosine Kinase in Fas Receptor-Mediated Apoptosis in Eosinophils / H.U. Simon, S. Yousefi, B. Dibbert et al. // *Blood*. – 1998. - Vol. 92. - №2. – P. 547-557.

239. Rollins, B.J. Chemokines / B.J. Rollins // *Blood*. – 1997. - Vol. 90. - №3. – P. 909-928.

240. Rothenberg, M.E. Eotaxin. An Essential Mediator of Eosinophil Trafficking into Mucosal Tissues / M.E. Rothenberg // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 21. - № 3. – P. 291-295.

241. Russell, S.M. Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor / S.M. Russell, A.D. Keegan, N. Harada // *Science*. – 1993. – Vol. 262. – P. 1880-1883.

242. Sallusto, F. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells / F. Sallusto, C.R. Mackay, A. Lanzavecchia // *Science*. - 1997. – Vol. 277. – P. 2005-2007.

243. Sandstrom, P.A. Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: Oxidative stress as a mediator of apoptosis / P.A. Sandstrom, M.D. Mannie, T.M. Buttke // *J. Leukoc. Biol.* – 1994. – Vol. 55. – P. 221.

244. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X<sub>L</sub> / J. Zha, H. Harada, E. Yang et al. // *Cell*. – 1996. – Vol. 87. – P. 619-628.

245. Shc phosphorylation in myeloid cells is regulated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor and is constitutively increased by p210BCR/ABL / T. Matsuguchi, R. Salgia, M. Hallek et al. // *J. Biol. Chem.* – 1994. – Vol. 269. – P. 5016-5021.

246. Signal transduction by the high-affinity GM-CSF receptor: two distinct cytoplasmic regions of the common  $\beta$  subunit responsible for different signaling / N. Sato, K. Sakamaki, N. Terada et al. // *EMBO J.* – 1993. – Vol. 12. – P. 4181-4189.

247. Simon, H.U. Inhibition of programmed eosinophil death: a key pathogenic event for eosiniphilia / H.U. Simon, K. Blaser // *Immunol. Today*. – 1995. – Vol. 16. - №2. – P. 53-55



248. Simon, H. Regulation of eosinophil apoptosis: Transduction of survival and death signals / H. Simon, R. Alam // *Int. Arch. Allergy Immunol.* - 1999. - Vol. 118. - P. 7.

249. Spontaneous and Glucocorticoid-Induced Apoptosis in Human Mature T Lymphocytes / M. Brunetti, N. Martelli, A. Colasante et al. // *Blood.* - 1995. - Vol. 86. - №11. - P. 4199-4205.

250. STAT6 is required for mediating responses to IL-4 and for the development of Th2 cells / M.H. Kaplan, U. Schindler, S.T. Smiley, M.J. Gruspy // *Immunity.* - 1996. - Vol. 4. - P. 313-319.

251. Superoxide release and NADPH oxidase components in mature human phagocytes: Correlation between functional capacity and amount of functional proteins / M. Yagisawa, A. Yuo, M. Yonemaru et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1996. - Vol. 228. - P. 510-516.

252. Tai, P.C. Effects of IL-5, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and IL-3 on the survival of human blood eosinophils *in vitro* / P.C. Tai, L. Sun, C.J. Spry // *Clin. Exp. Immunol.* - 1991. - Vol. 85. - P. 312-316.

253. Takai, K. Hypereosinophilic syndrome evolving to acute lymphoblastic leukemia / K. Takai, M. Sanada // *Int. J. Hematol.* - 1991. - Vol. 54. - P. 231-239.

254. Takeda, K. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling / K. Takeda, T. Tanaka, W. Shi // *Nature.* - 1996. - Vol. 380. - P. 627-630.

255. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease / J.E. Durbin, R. Hackenmiller, M.C. Simon, D.E. Levy // *Cell.* - 1996. - Vol. 84. - P. 443-450

256. Tec tyrosine kinase links the cytokine receptors to PI-3 kinase probably through JAK / M. Takahashi-Tezuka, M. Hibi, Y. Fujitani et al. // *Oncogene.* - 1997. - Vol. 14. P. 2273-2282.

257. Terada, K. Ras-dependent activation of c-jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in response to interleukin-3 stimulation in hematopoietic BaF3 cells / K. Terada, Y. Kaziro, T. Satoh // *J. Biol. Chem.* - 1997. - Vol. 272. - P. 4544-4548.

258. The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor / N. Ogata, Y. Kikuchi, T. Kouro et al. // *Int. Arch. Allergy. Immunol.* – 1997. – Vol. 114. – P. 24-27.

259. The anti-apoptotic gene *mcl-1* is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB / J.M. Wang, J.R. Chao, W. Chen et al. // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – Vol. 19. – P. 6195-6206.

260. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen / R. Watanabe-Fukunaga, C.I. Brannan, N. Itoh et al. // *J. Immunol.* – 1992. – Vol. 148. – P. 1274.

261. The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF / A. Kapp, G. Zeck Kapp, W. Czech, E. Schopf // *J. Invest. Dermatol.* – 1994. – Vol. 102. – P. 906-914

262. The GM-CSF analogue E21R induces apoptosis of normal and activated eosinophils / P.O. Iversen, D. Robinson, S. Ying, Q. Meng // *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* -1997. - Vol. 156. – P. 1628 – 1632.

263. The molecular biology of eosinophil granule proteins / K.J. Hamann, R.L. Barker, R.M. Ten, G.J. Gleich // *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* – 1991. – Vol. 94. – P. 202-209.

264. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis / N. Itoh, S. Yonehara, A. Ishii et al. // *Cell.* – 1991. – Vol. 66. – P. 233-243.

265. The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis / R.M. Kluck, E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, D.D. Newmeyer // *Science.* – 1997. – Vol. 275. - P. 1132-1136.

266. Um, H.-D. Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway / H.-D. Um, J.M. Orenstein, S.M. Wahl // *J. Immunol.* – 1996. – Vol. 156. – P. 3469.

267. Wang, H.G. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria / H.G. Wang, U.R. Rapp, J.C. Reed // *Cell*. – 1996. – Vol. 87. – P. 629-638.

268. Watanabe, S. Jak2 is essential for activation of *c-fos* and *c-myc* promoters and cell proliferation through the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in BA/F3 cells / S. Watanabe, T. Itoh, K. Arai. // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 12681-12686.

269. Widmann, C. Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals / C. Widmann, S. Gibson, G.L. Johnson // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 7141.

270. Ying, S. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 mRNA and protein in atopic asthma. Association with airway hyperresponsiveness and predominant co-localization of eotaxin mRNA to bronchial epithelial and endothelial cells / S. Ying, D.S. Robinson, Q. Meng // *Eur. J. Immunol.* – 1997. – Vol. 27. – P. 3507-3516.

271. Zangrilli, J.G. Regulation of Eosinophil Viability by Cytokines / J.G. Zangrilli // *Cell Mol. Biol.* – 2002. - Vol. 26, №4. - P. 388 - 390

272. Zimmermann, N. CC chemokine receptor-3 undergoes prolonged ligand-induced internalization / N. Zimmermann, J.J. Conkright, M.E. Rothenberg // *J. Biol. Chem.* - 1999. – Vol. 274. – P. 12611-12618.