

На правах рукописи

Колобовникова Юлия Владимировна

**МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ЦИТОКИНОПОСРЕДОВАННОЙ
КООПЕРАЦИИ ЭОЗИНОФИЛОВ И ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ
КЛЕТОК ПРИ ЛИМФОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЯХ СИСТЕМЫ КРОВИ**

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2007

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева
Наталья Владимировна

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

Новицкий
Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Агафонов
Владимир Иванович

доктор медицинских наук, профессор

Логвинов
Сергей Валентинович

Ведущая организация: ГУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии,
г. Санкт-Петербург

Защита состоится «___» _____ 2007 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Сибирском государственном медицинском университете (643050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке Сибирского государственного медицинского университета (643050, г. Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан «___» _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы внимание исследователей привлечено к синдрому эозинофилии преимущественно с позиции изучения патогенеза аллергических заболеваний и паразитарных инвазий [Фассахов Р.С. и соавт., 1992; Логинов А.С. и соавт., 1998; Джальчинова В. Б., Чистяков Г. М., 1999; Озерецковская Н.Н., 2000; Hamelmann E., Gelfand E.W., 2001; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Das A.M. et al., 2005]. Однако с явлением гиперэозинофилии ассоциирован целый ряд опухолевых заболеваний, среди которых особое внимание привлекают миело- и лимфопролиферативные заболевания системы крови [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Merz H. et al., 1991; Хорошко Н.Д. и соавт., 1998; Воробьев А.И., 2003; Чучалин А.Г., 2003; Комарова Л.С. и соавт., 2004; Caruso R.A. et al., 2004; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005; Абдулкадыров К.М., 2006]. В настоящее время актуальной остается проблема интерпретации причин возникновения и последствий синдрома гиперэозинофилии у больных с гемобластомами.

Исследованиями последних лет показано, что эозинофил является одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток воспаления [Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Беклемишев И.Д., 1998]. Эозинофильные гранулоциты служат источником большого количества цитотоксических продуктов, повышенное содержание которых обуславливает формирование высокого микробицидного потенциала, направленного не только в отношении инородных субстанций, но и окружающих тканей, что способствует возникновению различных осложнений длительной гиперэозинофилии (эозинофильные васкулиты, эндокардиты, гастроэнтериты и др.) [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Воробьев А.И. и соавт., 2000; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Волкова М.А., 2001; Чучалин А.Г., 2003; Ешану В.С., 2004]. Однако в свете современных данных эозинофильные гранулоциты рассматривают не только в качестве клеток-эффекторов, но и как важный фактор поддержания тканевого и иммунологического гомеостаза [Минеев В.Н. и соавт., 2000; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Эозинофилы обладают способностью экспрессировать на своей поверхности разнообразные рецепторы и продуцировать широкий спектр биологически активных веществ. Лейкоциты эозинофильного ряда за счет секреции иммунорегуляторных цитокинов - интерлейкина (IL)-4, IL-6, IL-2, IL-10 - участвуют в регуляции функций иммунокомпетентных клеток [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Волкова М.А., 2001; Ешану В.С., 2004].

Учитывая новые аспекты физиологического значения эозинофилов, особый интерес представляют данные об их способности взаимодействовать с иммунокомпетентными клетками макроорганизма. Важнейшую роль в становлении и стабилизации контактов между клетками играет цитокин-рецепторная сеть. Именно посредством цитокинов, синтезируемых и секретируемых клеткой, осуществляются лиганд-рецепторные взаимодействия за счет связывания растворимых веществ с аффинным рецептором на

клеточной поверхности [Кашкин К.Е., 1998; Ярилин А.А., 1999, 2001; Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2002, 2004]. Так, иммунокомпетентные клетки, продуцирующие IL-3, IL-4, IL-5 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) регулируют процессы пролиферации, дифференцировки и активации лейкоцитов эозинофильного ряда [Gulbenkian A.R. et al., 1992; Беклемишев И.Д., 1998; Минеев В.Н. и соавт., 2000; Намазова Л.С. и соавт., 2000; Nagase H. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002; Lampinen M. et al., 2004; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Существующая между клетками иммунной системы и эозинофилами взаимонаправленность эффектов обусловлена как иммуномодулирующим действием иммунокомпетентных клеток, так и способностью лейкоцитов эозинофильного ряда активировать иммуноциты и вызывать поляризацию иммунного ответа в ту или иную сторону за счет секреции иммунорегуляторных молекул. Дизрегуляция данных эффектов может обуславливать сдвиг процессов пролиферации, дифференцировки и активации эозинофилов, что приводит к их длительному пребыванию в периферической крови.

Цель исследования: установить роль нарушений цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов в механизмах формирования синдрома эозинофилии при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи исследования:**

1. Оценить морфо-функциональные свойства эозинофильных гранулоцитов периферической крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови (лимфогранулематоз, множественная миелома и неходжкинские лимфомы), ассоциированными с синдромом эозинофилии.
2. Определить уровень эотаксина в сыворотке крови и установить особенности продукции мононуклеарными лейкоцитами периферической крови цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF), регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофильных клеток, при гемобластозах, сопровождающихся синдромом эозинофилии.
3. Оценить состояние цитокин-рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов (рецепторов к IL-3, IL-5 и эотаксину) у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися выраженной эозинофилией.
4. Исследовать функциональный потенциал эозинофильных гранулоцитов в отношении экспрессии рецепторов к эозинофилстимулирующим цитокинам при инкубации клеток, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися синдромом эозинофилии, с рекомбинантными формами IL-3, IL-5 и эотаксина *in vitro*.

Научная новизна. Впервые с привлечением культуральных, иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования проведена комплексная оценка цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при

гемобластозах, сопровождающихся эозинофилией. Установлено, что механизмы формирования синдрома эозинофилии, осложняющего течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови, сопряжены с нарушением кооперативного взаимодействия эозинофильных гранулоцитов и мононуклеарных клеток, что выражается в увеличении продукции мононуклеарами IL-3, IL-5 и GM-CSF и повышении уровня эотаксина в сыворотке крови при возрастании экспрессии эозинофилами IL-3R, IL-5R и CCR3 в условиях дефицита Т-клеточного звена иммунной системы и сниженной секреции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. Получены новые данные, касающиеся снижения резервной способности эозинофильных гранулоцитов презентировать рецепторы к IL-3 и IL-5 при инкубации *in vitro* клеток с рекомбинантными формами одноименных цитокинов. У пациентов с лимфогранулематозом, множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами, сопровождающихся синдромом эозинофилии, впервые выявлены однотипные изменения морфо-функционального статуса эозинофильных гранулоцитов (увеличение содержания внутриклеточных катионных протеинов и пероксидазы, усиление фагоцитарной активности, наличие клеток с признаками дегрануляции и цитолиза). Установлено, что при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови, ассоциированных с выраженной эозинофилией, интенсификация кислороднезависимых и кислородзависимых процессов микробицидности опосредует формирование высокого цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов, что может обуславливать негативное влияние длительной гиперэозинофилии крови при гемобластозах.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные фундаментального характера о нарушении цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови раскрывают новые патофизиологические аспекты формирования синдрома эозинофилии. Результаты исследования могут быть положены в основу разработки патогенетически обоснованных молекулярных технологий коррекции дисрегуляции кооперативного взаимодействия эозинофилов и иммунокомпетентных клеток при гемобластозах, ассоциированных с выраженной эозинофилией, с целью лечения и профилактики осложнений длительной гиперэозинофилии крови.

Положения, выносимые на защиту:

1. Механизмы формирования синдрома эозинофилии при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови сопряжены с нарушением цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов.
2. Механизмы нарушения кооперации эозинофилов и мононуклеарных клеток при синдроме эозинофилии, осложняющем течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови, опосредованы повышением продукции цитокинов, являющихся ключевыми в регуляции гомеостаза эозинофильных клеток (IL-3, IL-5, GM-CSF и эотаксина), при дисбалансе экспрессии эозинофилами

комплементарных им рецепторов (IL-3R, IL-5R и CCR3) в условиях дефицита Т-клеточного звена иммунной системы и сниженной секреции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами.

3. При лимфопролиферативных заболеваниях системы крови (лимфогранулематоз, множественная миелома и неходжинские лимфомы), ассоциированных с синдромом эозинофилии, эозинофильные гранулоциты претерпевают выраженные однотипные изменения морфологических и цитотоксических свойств.

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на Международном конгрессе «Иммунитет и болезни: от теории к терапии» (Москва, 2005), I Съезде физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» (Сочи, 2005), 5-й научно-практической конференции с международным участием «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2006), VIII Конгрессе «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении» (Москва, 2006), XII Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2006), Российском медицинском форуме-2006 «Фундаментальная наука и практика» (Москва, 2006), Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной памяти профессора Н.Н. Кеворкова «Иммунитет и аллергия: от эксперимента к клинике» (Пермь, 2006).

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом при Президенте 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-исследовательской работы «Роль нарушений межклеточной кооперации в механизмах формирования больших эозинофилий крови» (Государственный контракт №02.442.11.7056 от 26.10.2005), выполненной в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 работ, из которых 5 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 152 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 9 рисунками и 13 таблицами. Библиографический указатель включает 252 источника (105 - отечественных и 147 - иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе представлены результаты комплексного обследования 130 больных (59 мужчин и 71 женщины в возрасте от 18 до 60 лет) со злокачественными заболеваниями системы крови (табл. 1): из них 97 пациентов с первичным обращением в стационар по поводу лимфопролиферативного заболевания системы крови и 33 пациента, находящихся на диспансерном учете и получавших от 2 до 6 курсов полихимиотерапии (не менее чем 1-3 года назад).

Все пациенты были обследованы до назначения терапии при поступлении в отделение гематологии Томской областной клинической больницы (главный врач – Заслуженный врач РФ Б.Т. Серых). Набор клинического материала осуществлялся при участии заведующей отделением гематологии В.Ю. Гранкиной и врача-гематолога Е.Н. Кнутаревой.

Все больные со злокачественными заболеваниями системы крови, ассоциированными с синдромом эозинофилии, были разделены на три группы. Первую группу составили 25 пациентов с лимфогранулематозом (по МКБ-10 рубрика С81): из них 9 - со смешанно-клеточным вариантом заболевания (С81.2), 10 - с нодулярным склерозом (С81.1), 6 – 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 (10 пациентов) и III Бб стадией (13 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 30 пациентов с множественной миеломой (рубрика С90.0 МКБ-10): их них 28 человек – 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 38 больных неходжкинскими лимфомами (рубрики С82 и С83 по МКБ-10): 20 человек с лимфомой из периферических (зрелых) клеток (12 – со зрелоклеточной лимфомой, 2 - с пролимфоцитарной, 2 - с лимфоцитарной, 4 - с В-мелкоклеточной), 4 - с В-крупноклеточной, 14 – с фолликулярной. При этом у 16 пациентов с неходжкинскими лимфомами отмечали III Аб стадию процесса, у 22 - III Бб стадию. При диагностике неходжкинских лимфом обязательной являлась гистологическая оценка субстрата опухоли, дополненная иммунологическим и цитогенетическим методами исследования.

Распределение здоровых доноров и пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных			
	Здоровые доноры	Пациенты с лимфогранулематозом	Пациенты с множественной миеломой	Пациенты с неходжкинскими лимфомами
Определение показателей лейкоцитарного звена периферической крови (общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание эозинофилов и лимфоцитов)	22	38	41	51
Определение содержания внутриклеточных катионных протеинов и пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах цитохимическим методом	19	23	27	35
Определение фагоцитарной активности эозинофилов периферической крови в НСТ-тесте	17	19	22	25
Морфологическое исследование эозинофильных гранулоцитов в условиях инкубации с антигеном <i>O.felineus</i>	18	19	21	26
Оценка количества эозинофилов, презентующих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину, методом проточной цитофлуориметрии	15	14	15	17
Определение количества лимфоцитов крови, презентующих CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ и CD22 ⁺ -маркёры иммуноцитохимическим методом	16	32	30	34
Исследование содержания IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и уровня эотаксина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	18	33	31	35

Группу сравнения составили 37 пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови (из них: 13 больных лимфогранулематозом, 11 – множественной миеломой, 13 – неходжкинскими лимфомами) без синдрома эозинофилии с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

В контрольную группу были включены 22 здоровых донора с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, 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).

Определение общего количества лейкоцитов периферической крови и подсчет их отдельных морфологических форм проводили стандартными гематологическими методами [Меньшиков В.В., 1987].

Оценку содержания CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- и CD22⁺-несущих лимфоцитов осуществляли иммуноцитохимическим методом с помощью набора реагентов фирмы «Дакко» (Дания). При микроскопии идентифицировали окрашенный продукт иммуноферментной реакции, образовавшийся в местах связывания выявляемых антигенов. Положительно окрашенными считались лимфоциты, по окружности которых продукт реакции занимал не менее трети. Проводили подсчет 200 клеток, определяли процент положительно окрашенных клеток [Тотолян А.А. и соавт., 2002].

Мононуклеары выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования с использованием Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). Выделенные клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37° и 5% CO₂ в полной культуральной среде (90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% инактивированная эмбриональная телячья сыворотка («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамин) без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА) («Difco», Германия) для активации лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 1995]. Затем проводили оценку содержания цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF) в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и эотаксина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Biosource», Бельгия). Учет результатов иммуноферментного анализа производили с применением фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм.

Выделение эозинофильных гранулоцитов проводили с использованием пятиступенчатого градиента Percoll («Amersham Biosciences AB», Швеция) (1,070, 1,081, 1,090, 1,095 и 1,105) [Gartner I., 1980]. Выделенные клетки культивировали в течение 18 ч при температуре 37°С и 5% CO₂ в 96-луночных иммунологических планшетах в полной культуральной среде (90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина и 2мМ/мл HEPES («Flow», GB)). Затем проводили оценку морфо-функционального статуса эозинофильных гранулоцитов с использованием цитохимических методов исследования. Оценивали содержание пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах методом Грэхема-Кнолля [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983]. Содержание неферментных катионных протеинов в эозинофилах периферической крови определяли цитохимическим методом М.Г. Шубича [Меньшиков В.В., 1987]. Морфологическое исследование эозинофильных гранулоцитов проводили в условиях их инкубации с антигеном *O.felineus* по методу Е.С. Нишевой и соавт. [1995]. Фагоцитарную активность эозинофилов периферической крови оценивали методом J.S. Steward et al. в модификации Б.С. Нагоева [Меньшиков В.В., 1987].

В рамках диссертационной работы проводили оценку состояния рецепторного аппарата эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися синдромом эозинофилии, а также у здоровых доноров, *in vitro* без стимуляции и

в условиях инкубации эозинофильных клеток с рекомбинантными формами цитокинов. Для этого выделенные эозинофилы периферической крови культивировали в отсутствие стимуляции или с добавлением рекомбинантного (r) IL-3 («Biosource», Бельгия), r-IL-5 («Biosource», Бельгия) или r-эотаксина («Biosource», Бельгия) в концентрации 10^{-8} г/мл. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37° и 5% CO₂. Оценку презентации мембраносвязанных форм рецепторов к IL-3, IL-5 и эотаксину на эозинофилах крови проводили методом проточной лазерной двухцветной цитометрии с использованием моноклональных антител к цитокиновым рецепторам, меченных флюоресцентными метками. Регистрацию презентации цитокиновых рецепторов на эозинофилах проводили согласно протоколу фирмы производителя («R&D Systems», США). Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) с применением автоматического программного обеспечения и методов сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала).

Статистический анализ результатов исследования проводили с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли с применением критерия Shapiro-Wilk's. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках гипотезы о равенстве средних выборочных величин проверяли 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 Манна Уитни для независимых групп. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления функциональных взаимосвязей между группами изученных параметров применяли корреляционный анализ путем вычисления r-коэффициента Спирмена [Боровиков В., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день эозинофильный гранулоцит занимает одно из центральных мест при изучении патогенеза аллергических заболеваний и паразитарных инвазий: при аллергической патологии эозинофилы рассматриваются как основные компоненты ее развития, а при гельминтозах - как бесспорные факторы защиты. В то же время представления о роли эозинофилов и эозинофилии при формировании опухолевого процесса существенно ограничены.

Известно, что с явлением гиперэозинофилии ассоциирован целый ряд опухолевых заболеваний системы крови [Merz H. et al., 1991; Трапезников Н.Н. и соавт., 1996; Хорошко Н.Д. и соавт., 1998; Морозова В.Т. и соавт., 2000; Волкова М.А., 2001; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Абдулкадыров К.М., 2006]. Так, синдром эозинофилии является одним из проявлений опухоли миелоидной ткани и встречается при острых миело- и

миеломонобластном лейкозах, миелодиспластическом синдроме и других миелопролиферативных заболеваниях [Абдулкадыров К.М. и соавт., 2002]. Вместе с тем, выраженная эозинофилия и инфильтрация эозинофилами лимфатических узлов может наблюдаться при Т- и В-клеточных хронических лимфопролиферативных заболеваниях [Tavani A. et al., 2000; Мокеева Р.А. и соавт., 2001; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005]. У обследованных нами пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови был выявлен синдром эозинофилии, который характеризовался высокими значениями количества эозинофилов в крови (у пациентов с лимфогранулематозом - $25,79 \pm 4,29\%$ ($p=0,003$), множественной миеломой - $16,86 \pm 2,63\%$ ($p=0,014$), неходжкинскими лимфомами - $15,18 \pm 2,66\%$ ($p=0,042$) при норме $2,18 \pm 0,06\%$). На сегодняшний день актуальной остается проблема интерпретации причин возникновения и последствий гиперэозинофилии у больных с неопластическими заболеваниями системы крови.

Общеизвестно, что эозинофил является одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток воспаления [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Минеев В.Н. и соавт., 2000]. Наряду с этим, в современной литературе эозинофильные гранулоциты принято рассматривать в качестве регуляторов тканевого и иммунологического гомеостаза. Благодаря способности секретировать широкий спектр биологически активных веществ и экспрессировать на своей поверхности разнообразные рецепторные структуры, лейкоциты эозинофильного ряда принимают участие в регуляции функций иммунокомпетентных клеток, в процессах клеточной репарации, свертывания крови и др. [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Минеев В.Н. и соавт., 2000; Воробьев А.И., 2003; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Принимая во внимание новые аспекты физиологического значения эозинофилов, особый интерес, на наш взгляд, представляют данные об их способности взаимодействовать с иммунокомпетентными клетками макроорганизма.

Несмотря на значительные достижения в онкоиммунологии, представления о роли эозинофилов и эозинофилии в опухолевом процессе в настоящее время существенно ограничены. По данным литературы, эозинофилия, обнаруживаемая в крови и в области локализации опухоли у онкологических больных, в одних случаях может быть ассоциирована с благоприятным прогнозом, а в других - может явиться негативным признаком [Зеленова О.В., 2002; Бережная Н.М., 2005]. Противоопухолевую активность эозинофилов связывают с их способностью к фагоцитозу и цитотоксическому действию [Goldman M. et al., 2001].

Известно, что цитотоксический потенциал эозинофильных гранулоцитов осуществляется за счет кислороднезависимых и кислородзависимых механизмов микробицидности [Воробьев А.И., 2002]. К числу кислороднезависимых факторов цитотоксичности относится группа белков, важнейшим среди которых является большой основной протеин, реализующий свое цитотоксическое действие в комплексе с другими белками - эозинофильным катионным протеином и пероксидазой [Rothenberg M.D., 1987;

Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Волкова М.А., 2001; Ешану В.С., 2004].

В ходе проведенного нами цитохимического исследования у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися синдромом эозинофилии, было отмечено повышение содержания лизосомальных катионных белков и пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах (у пациентов с лимфогранулематозом значения средних цитохимических коэффициентов (СЦК) содержания внутриклеточных катионных белков и пероксидазы оказались равными $2,93 \pm 0,02$ усл. ед. ($p=0,011$) и $2,95 \pm 0,03$ усл. ед. ($p=0,043$), соответственно, множественной миеломой - $2,95 \pm 0,06$ усл. ед. ($p=0,003$) и $2,79 \pm 0,07$ усл. ед. ($p=0,039$), соответственно, неходжкинскими лимфомами - $2,42 \pm 0,08$ усл. ед. ($p=0,041$) и $2,69 \pm 0,07$ усл. ед. ($p=0,048$), соответственно, при норме $2,17 \pm 0,07$ усл. ед. и $2,53 \pm 0,07$ усл. ед., соответственно). Увеличение содержания внутриклеточных катионных протеинов и пероксидазы в эозинофилах периферической крови у обследованных нами пациентов свидетельствует об усилении функциональной активности изученных клеток.

Согласно современным представлениям, эозинофильные гранулоциты относятся к группе полиморфноядерных лейкоцитов, обладающих способностью к фагоцитозу. Последний сопровождается образованием активных форм кислорода, крайне токсичных для многих микроорганизмов; вместе с тем они обладают выраженным повреждающим действием в отношении многих клеток организма [Маянский Д.Н., Урсов И.Г., 1997; Воробьев А.И., 2003]. Исследование фагоцитарной активности эозинофилов периферической крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями, ассоциированными с выраженной эозинофилией, позволило констатировать факт увеличения количества диформаза-позитивных клеток в спонтанном НСТ-тесте по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (у пациентов с лимфогранулематозом - $0,30 \pm 0,01$ Г/л, $p=0,001$, множественной миеломой - $0,15 \pm 0,03$ Г/л, $p=0,039$, неходжкинскими лимфомами - $0,12 \pm 0,02$ Г/л, $p=0,044$, при норме $0,01 \pm 0,01$ Г/л). При этом у обследованных нами пациентов показатели НСТ-теста, стимулированного пирогеналом, существенно не отличались от соответствующих базальных величин, что может свидетельствовать об угнетении потенциального резерва цитотоксичности лейкоцитов эозинофильного ряда в условиях их пролонгированной стимуляции.

В целом интенсификация кислородзависимых процессов киллинга в эозинофилах периферической крови, по-видимому, обусловлено их повышенной функциональной реактогенностью, в условиях которой эозинофилы могут реализовывать свой биоцидный потенциал при контакте с различными чужеродными белками, в том числе и с опухолевыми клетками.

Не вызывает сомнения тот факт, что адекватное функционирование клеток макроорганизма во многом определяется полноценностью их структур. В результате исследования морфологических особенностей эозинофильных лейкоцитов у больных гемобластомами, ассоциированными с синдромом

эозинофилии, в отсутствие антигенной стимуляции нами было зарегистрировано увеличение содержания эозинофилов с признаками повреждения ядра и цитоплазмы по сравнению с аналогичными показателями нормы (у пациентов с лимфогранулематозом - $8,70 \pm 1,02\%$, $p=0,025$, множественной миеломой - $6,89 \pm 0,83\%$, $p=0,031$, при норме $2,54 \pm 0,05\%$). В условиях инкубации с антигеном *O.felineus* количество морфологически измененных лейкоцитов эозинофильного ряда также статистически значимо превышало средние значения этих параметров в контрольной группе (у пациентов с лимфогранулематозом - $24,50 \pm 1,19\%$, $p=0,023$, множественной миеломой - $18,92 \pm 1,22\%$, $p=0,029$, неходжкинскими лимфомами - $19,50 \pm 0,18\%$, $p=0,033$, при норме $5,02 \pm 0,07\%$). Выявленные изменения морфологии эозинофильных гранулоцитов носили преимущественно характер дегрануляции и цитолиза (разбухшие клетки в 2 и более раз превышали размеры нейтрофилов, их оболочка была разорвана, отмечалось внеклеточное накопление эозинофильных гранул, в некоторых препаратах обнаруживался распад ядра на хроматиновые нити). Была зарегистрирована повышенная вакуолизация ядра и цитоплазмы эозинофильных гранулоцитов. Следует отметить, что повышение дегрануляции эозинофилов, выявленное нами при вышеуказанных нозологиях, с одной стороны, может являться следствием их гиперактивации, а, с другой, - быть фактором, потенцирующим цитотоксичность эозинофильных гранулоцитов.

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что усиление кислороднезависимых и кислородзависимых механизмов киллинга эозинофилов, обнаруженное нами при злокачественных заболеваниях системы крови, ассоциированных с синдромом эозинофилии, обуславливает формирование высокого цитотоксического потенциала эозинофильных клеток, действие которого может реализоваться не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма. Последнее обстоятельство, вероятно, обуславливает негативное влияние длительной эозинофилии крови на организм и может осложнять течение основного заболевания.

Согласно современным представлениям, механизмы формирования высокой эозинофилии при опухолевом процессе могут быть обусловлены продукцией хемотаксических факторов клетками некоторых опухолей [Jundt F. et al., 1999; Бережная Н.М., 2000; Воробьев А.И., 2000; Abrahamsen A.F., 2000; Зеленова О.В. и соавт., 2002]. В то же время эозинофильная реакция может рассматриваться как своеобразный «иммунный ответ» на антигенную стимуляцию опухолевой тканью. Наконец, длительная эозинофилия и появление в кровотоке эозинофильных лейкоцитов с увеличенным сроком рециркуляции при опухолевых заболеваниях могут быть обусловлены подавлением или дефектами системы апоптотической гибели эозинофилов [Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Принимая во внимание тот факт, что нарушение кооперативного взаимодействия иммунокомпетентных клеток и эозинофилов может обуславливать дисрегуляцию процессов пролиферации, дифференцировки и

активации эозинофильных гранулоцитов, мы провели исследование механизмов цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов в реализации феномена эозинофилии при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови.

Известно, что иммунная система, обладая уникальными свойствами саморегуляции и самоуправления, осуществляет тесную интеграцию между основными системами макроорганизма и обеспечивает стабильность гомеостаза путем специфического распознавания и обезвреживания чужеродного материала [Ярилин А. А., 1997]. Доминирующее качество интегральной гомеостатической системы – избирательное вовлечение в иммунный ответ лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы и несущих определенную антигенную детерминанту [Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2004].

Проведенный нами анализ показателей, характеризующих субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови, сопровождающимися длительной эозинофилией крови, и у больных гемобластозами без синдрома эозинофилии позволил констатировать факт изменения параметров, характеризующих способность лимфоцитарных клеток экспрессировать маркеры клеточной дифференцировки. Так, у больных гемобластозами вне зависимости от нозологии и наличия эозинофилии периферической крови, отмечалось значительное уменьшение содержания $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ -клеток, а также снижение иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$) по сравнению с соответствующими величинами у лиц контрольной группы. Выявленный нами Т-клеточный дефицит при лимфопролиферативных заболеваниях, с одной стороны, по-видимому, обусловлен способностью опухолевых клеток индуцировать иммуносупрессию, а, с другой, - может быть следствием усиления миграционных процессов клеток в опухолевую ткань, поскольку известно, что неопластически трансформированные клеточные элементы являются мишенями иммунной атаки со стороны нормальных Т-лимфоцитов, составляющих основу клеточной популяции пораженных лимфатических узлов [Зеленова О.В. и соавт., 2002; Воробьев А.И., 2003; Олейник Е.К. и соавт., 2006; Хват Н.С. и соавт., 2006; Чубукина Ж.В. и соавт., 2006]. Полученные нами данные подтверждаются результатами других исследователей, согласно которым, лимфопролиферативные заболевания системы крови характеризуются угнетением Т-клеточного звена иммунитета [Serrano D. et al. 1997; Ayoub J.P. et al., 1999; Воробьев А.И. и соавт., 2000; Лорие Ю.Ю., 2000; Смирнова О.В. и соавт., 2006].

Очевидно, что адекватное функционирование иммунной системы обусловлено взаимодействием широкого спектра клеток – макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, фибробластов, нейтрофилов, эозинофилов и др. [Хаитов Р.М. и соавт. 2000; Фрейдлин И.С., 2001]. Ключевую роль в становлении и стабилизации контактов между взаимодействующими клеточными элементами, в частности клетками крови, играет цитокин-рецепторная сеть [Беклемишев

И.Д., 1998; Кашкин К.Е., 1998; Ярилин А.А., 1999, 2001; Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2002, 2004].

Известно, что сбалансированность цитокиновой регуляции основывается на равновесии альтернативных по биологической активности пулов молекул, нарушение которого ведет к развитию патологии [Pritchard D.I. et al., 1993; Кетлинский С.А., 2002]. Согласно современным представлениям, поляризация иммунного ответа преимущественно в сторону Th-2 пути может обуславливать формирование синдрома эозинофилии при различных злокачественных новообразованиях, в частности при гемобластозах [Newcom S.R. et al., 1992; Медуницын Н.В., 1993; Бережная Н.М., 2000; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Данное обстоятельство связано со способностью многих цитокинов (IL-5, IL-4, IL-3 и GM-CSF), продуцируемых Th-2-лимфоцитами, участвовать в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и активации эозинофильных гранулоцитов [Gulbenkian A.R. et al., 1992; Беклемишев И.Д., 1998; Минеев В.Н. и соавт., 2000; Намазова Л.С. и соавт., 2000; Nagase H. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

Ключевым медиатором, регулирующим функциональную активность эозинофилов, является IL-5, который избирательно стимулирует образование лейкоцитов эозинофильного ряда из их коммитированного предшественника (КОЕ-Эо). IL-5, а также IL-3 и GM-CSF активируют дегрануляцию эозинофильных гранулоцитов, что сопровождается высвобождением цитотоксичных протеинов, регулируют экспрессию интегриновых молекул (CD11b, CD18) и посредством ингибирования апоптотической гибели лейкоцитов эозинофильного ряда, пролонгируют время их пребывания в кровотоке [Yamaguchi Y. et al., 1991; Беклемишев И.Д., 1998; Бережная Н.М., 2000; Хайтов Р.М., 2000; Nagase H. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002; Barnes P.J., 2003; Бережная Н.М. и соавт., 2005] (рис. 1).

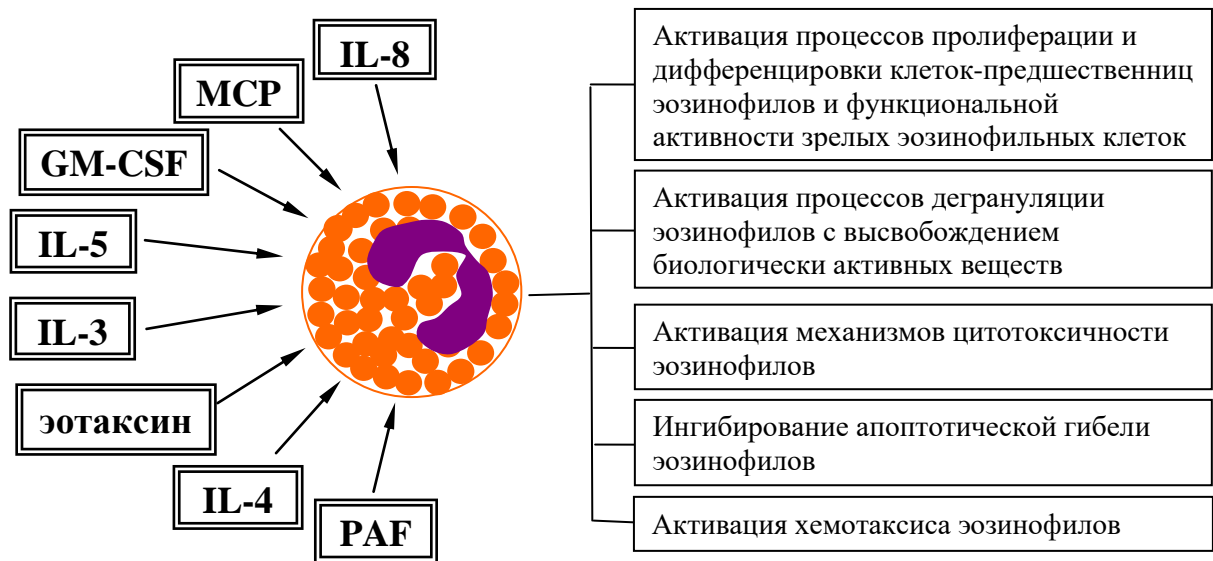
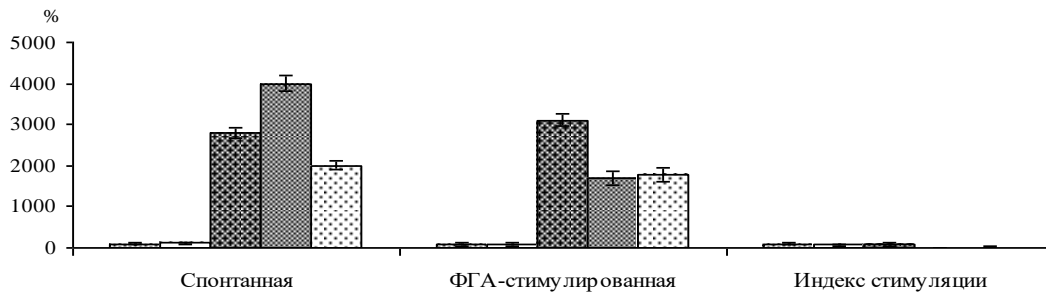


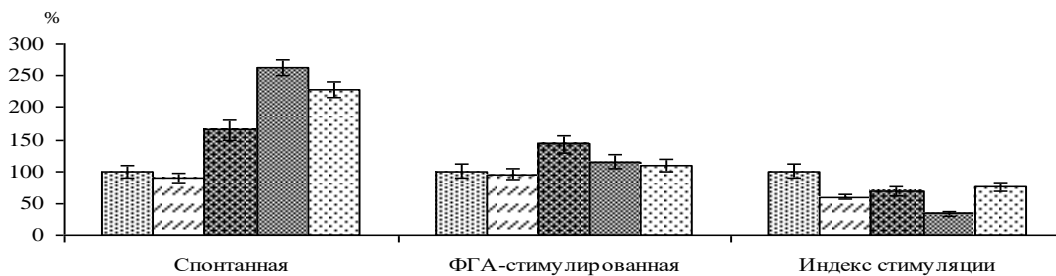
Рис. 1. Ключевые цитокины, модулирующие функциональную активность эозинофильных гранулоцитов [по данным И.Д. Беклемишева, 1998; А.А. Тотоляна, 2001; А.И. Воробьева, 2002]

Как показали проведенные нами исследования, у больных гемобластозами, ассоциированными с синдромом эозинофилии, отмечалось значимое увеличение уровней конституциональной продукции ИЛ-5, ИЛ-3 и GM-CSF мононуклеарными клетками периферической крови по сравнению с аналогичными значениями у здоровых доноров и пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови без синдрома эозинофилии. В то же время значения индекса стимуляции продукции вышеуказанных цитокинов у больных гемобластозами, ассоциированными с высокой степенью эозинофилии, снижались более чем в 2 раза по сравнению с его уровнем у здоровых доноров, не отличаясь от показателей у пациентов без эозинофилии (рис. 2).

А



Б



В



- Здоровые доноры
- Пациенты с гемобластозами без синдрома эозинофилии
- ▨ Пациенты с лимфогранулематозом
- ▩ Пациенты с множественной миеломой
- ▤ Пациенты с неходжкинскими лимфомами

Рис. 2. Продукция ИЛ-5 (А), ИЛ-3 (Б) и GM-CSF (В) мононуклеарными лейкоцитами периферической крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися эозинофилией

Данное обстоятельство, по-видимому, свидетельствует о снижении резервной способности Th-2-лимфоцитов продуцировать эозинофилстимулирующие цитокины [Dirks W. et al., 1997; Jundt F. et al., 1999; Abrahamsen A.F., 2000].

По данным литературы, именно повышенная продукция IL-5 – ключевого медиатора, модулирующего функциональную активность эозинофилов, обуславливает формирование синдрома эозинофилии, сопровождающего аллергические заболевания и паразитарные инвазии. У обследованных нами пациентов с лимфогранулематозом и множественной миеломой, ассоциированных с синдромом эозинофилии, было обнаружено наличие корреляционных связей между базальной продукцией мононуклеарными лейкоцитами IL-5 и относительным количеством эозинофильных гранулоцитов, что подтверждает наличие тесной взаимосвязи между изучаемыми показателями ($r=0,620$, $p<0,05$ и $r=0,735$, $p<0,05$, соответственно).

Способностью активировать эозинофилы обладает также IL-4, который совместно с TNF α и IL-13, усиливает уровень экспрессии CD69 на мембране эозинофильных гранулоцитов, обуславливая тем самым снижение их апоптотической гибели [Luttmann W. et al., 1999] (рис. 1). В результате исследования содержания IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у больных со злокачественными заболеваниями системы крови, сопровождающимися длительной эозинофилией крови, и у пациентов с гемобластозами без синдрома эозинофилии вне зависимости от нозологии было выявлено снижение конституциональной и индуцибельной продукции данного цитокина по сравнению с нормальными значениями (у пациентов с лимфогранулематозом медианные значения базальной и ФГА-стимулированной продукции IL-4 составляли - 18,17 (16,22-20,01) пг/мл, $p=0,017$ и 27,82 (27,22-28,98) пг/мл, $p=0,041$, соответственно, множественной миеломой - 18,44 (15,00-21,09) пг/мл, $p=0,023$ и 22,32 (19,09-22,67) пг/мл, $p=0,001$, соответственно, неходжкинскими лимфомами - 15,02 (13,45-20,10) пг/мл, $p=0,031$ и 21,73 (20,03-22,48) пг/мл, $p=0,001$, соответственно, у больных гемобластозами без синдрома эозинофилии - 17,56 (15,28-19,84) пг/мл, $p=0,029$ и 23,25 (20,93-25,57) пг/мл, $p=0,019$, соответственно при норме 26,43 (25,21-27,58) пг/мл и 42,30 (32,31-54,30) пг/мл, соответственно). Выявленные изменения, скорее всего, следует рассматривать с позиции опухолевого процесса, поскольку известно, что IL-4 является мощным ингибитором роста опухолевых клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. Дисбаланс продукции рассматриваемого цитокина при неопластических заболеваниях, по-видимому, может явиться одним из основных звеньев, способствующих снижению противоопухолевой защиты организма, и, как следствие, - неизбежной прогрессии заболевания.

Формирование высокой эозинофилии при гемобластозах может быть опосредовано действием эотаксина – хемокина, специфично действующего в отношении лейкоцитов эозинофильного ряда (рис. 1). Основными продуцентами данного медиатора являются эпителиальные клетки и сами эозинофилы. В связи с этим концентрацию эотаксина у больных с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися

синдромом эозинофилии, мы оценивали в сыворотке крови. В ходе исследования было зарегистрировано значительное повышение уровня эотаксина в сыворотке крови у больных с лимфогранулематозом (115,0 (63,82-140,5) пг/мл, $p=0,045$), тогда как у пациентов с множественной миеломой и у больных с неходжкинскими лимфомами значения данного показателя не отличались от контроля ($p=0,069$ и $p=0,065$) и аналогичных параметров у пациентов без эозинофилии ($p=0,063$ и $p=0,070$). Вместе с тем у больных лимфогранулематозом нами было обнаружено наличие корреляционных связей между концентрацией эотаксина и относительным содержанием эозинофилов периферической крови ($r=0,502$, $p<0,05$), что указывает на значительную роль данного хемокина в механизмах формирования феномена эозинофилии.

Таким образом, в результате проведенного нами исследования у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови, сопровождающимся синдромом эозинофилии, на фоне количественного дефицита Т-клеток выявлен существенный дисбаланс секреции мононуклеарными лейкоцитами ключевых медиаторов, принимающих участие в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и последующей активации эозинофильных гранулоцитов.

Не вызывает сомнения тот факт, что изучение молекулярных механизмов межклеточной кооперации заключается, с одной стороны, в оценке продукции медиаторов, опосредующих кооперативное взаимодействие клеток. С другой стороны, обязательным этапом подобных исследований является анализ клеточных рецепторных структур.

Согласно современным представлениям, эозинофилы на своей мембране несут разнообразные антигенные структуры, среди которых несомненный интерес представляют рецепторы для цитокинов [Воробьев А.И., 2001; Минеев В.Н. и соавт., 2001; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Показано, что эозинофилы презентуют рецепторы (R) к IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, эотаксину (CCR3) и GM-CSF [Воробьев А.И., 2001; Минеев В.Н. и соавт., 2001; Бережная Н.М. и соавт., 2005] (рис. 3). Стимуляция эозинофильных лейкоцитов антигенными детерминантами приводит к синтезу определенного набора медиаторов, экспрессии соответствующих цитокиновых рецепторов и активации опосредуемых ими функций [Bochner B.S., 2000].

Проведенное нами исследование презентации рецепторов к IL-5, IL-3 и эотаксину в интактной культуре эозинофилов *in vitro*, полученных у больных гемобластозами, ассоциированными с синдромом эозинофилии, позволило констатировать факт увеличения абсолютного и относительного количества IL-5R-, IL-3R- и CCR3-позитивных клеток по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров. При этом у больных неходжкинскими лимфомами содержание эозинофилов, несущих IL-3R, соответствовало нормальным значениям (рис. 4).

Установленное в результате настоящего исследования увеличение фракции эозинофильных клеток, презентующих IL-5R, IL-3R и CCR3, у пациентов с гемобластозами может быть опосредовано, вероятно, влиянием одноименных медиаторов, секретлируемых в избыточных концентрациях мононуклеарными лейкоцитами периферической крови, опухолевыми клетками или самими



Рис. 3. Рецепторный аппарат эозинофильных гранулоцитов [по данным А.И. Воробьева, 2002; Н.М. Бережной и соавт., 2005]

эозинофилами. Вместе с тем, усиление рецепторэкспрессирующей способности эозинофильных гранулоцитов при синдроме эозинофилии, осложняющем течение гемобластозов, может быть результатом токсического действия неопластически трансформированных клеток крови.

При стимуляции эозинофильных клеток, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися выраженной эозинофилией, *in vitro* рекомбинантным (r) IL-5, r-IL-3 и r-эотаксином у всех обследованных пациентов вне зависимости от нозологии отмечалось повышение относительного и абсолютного содержания IL-5R- и CCR3-несущих эозинофилов и абсолютного числа клеток эозинофильного ряда, экспрессирующих IL-3R по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе (рис. 4). При этом для определения соотношения клеток, несущих цитокиновые рецепторы в базальной культуре, к таковому в условиях инкубации с одноименными рекомбинантными цитокинами нами были рассчитаны индексы стимуляции. Значения индексов стимуляции презентации IL-5R и IL-3R у больных лимфогранулематозом и пациентов с множественной миеломой оказались достоверно ниже аналогичных показателей в норме. Индекс стимуляции экспрессии CCR3 у всех пациентов соответствовал контрольным значениям. Данное обстоятельство свидетельствует о снижении резервной способности эозинофильных гранулоцитов экспрессировать рецепторы к IL-5 и IL-3. По-видимому, при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови эозинофилы с изначально высокой способностью презентировать рецепторы к эозинофилстимулирующим цитокинам в условиях дополнительной стимуляции не способны адекватно воспринимать активационные цитокиновые сигналы.

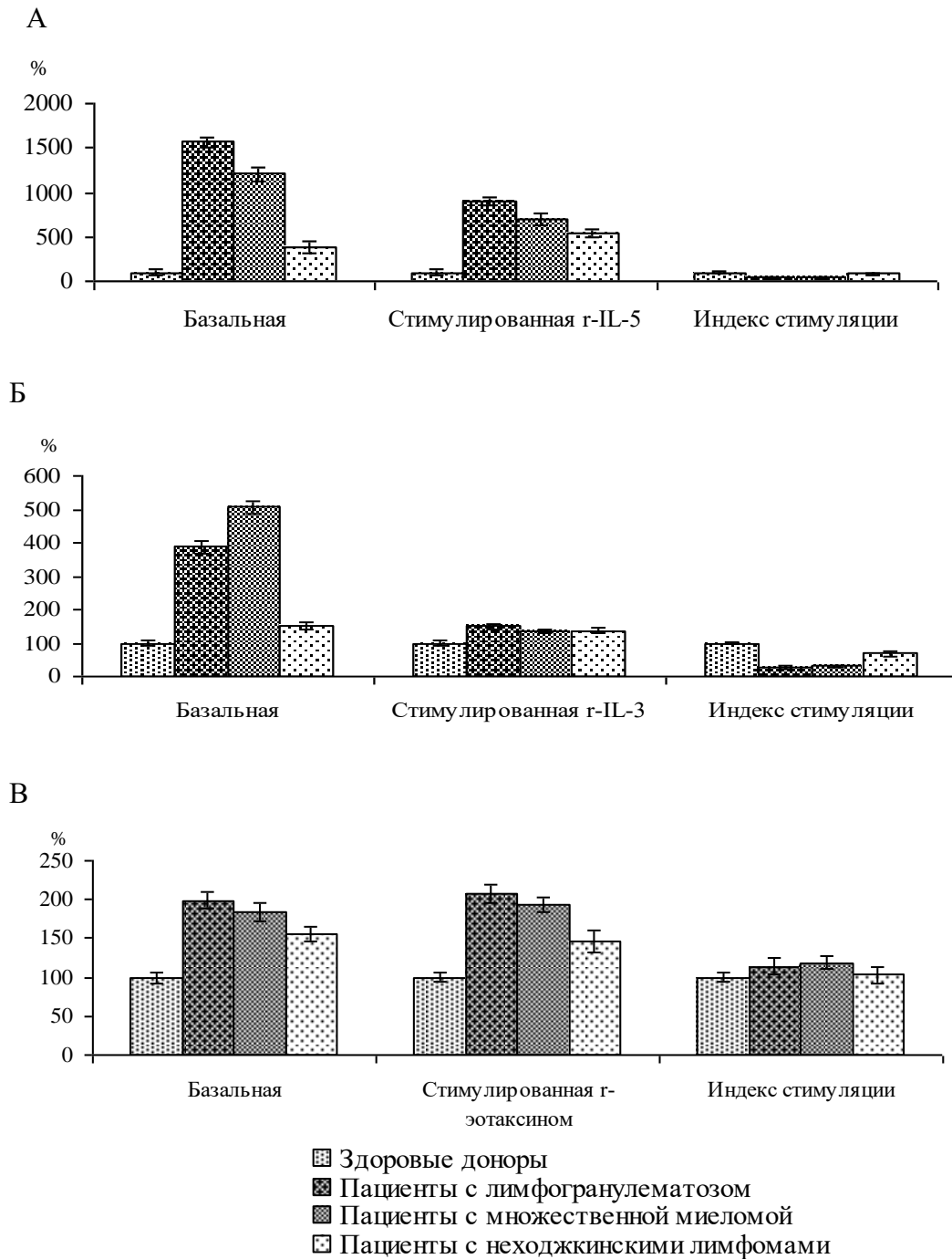


Рис. 4. Содержание IL-5R- (А), IL-3R- (Б) и CCR3-позитивных клеток (В) в культуре эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися эозинофилией

Дисбаланс экспрессии эозинофильными гранулоцитами рецепторов к цитокинам, модулирующим их функциональную активность, может являться еще одним механизмом, лежащим в основе длительного пребывания эозинофилов в периферической крови при гемобластозах. У пациентов с лимфогранулематозом это подтверждается наличием корреляции между относительным количеством клеток, презентующих рецепторы к IL-5 и эотаксину, и относительным содержанием эозинофильных гранулоцитов периферической крови ($r=0,863$, $p<0,05$ и $r=0,641$, $p<0,05$, соответственно).

В целом полученные нами результаты исследования свидетельствуют о том, что синдром эозинофилии, осложняющий течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови, сопровождается увеличением продукции ключевых цитокинов, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофилов, (IL-5, IL-3 и GM-CSF) мононуклеарами и уровня эотаксина в периферической крови на фоне количественного дефицита Т-клеточного звена иммунной системы и сниженной секреции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами. В то же время у всех пациентов с гемобластозами, ассоциированными с эозинофилией, зарегистрировано повышенное количество эозинофильных клеток, несущих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину. При дополнительном воздействии на эозинофильные клетки, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися эозинофилией, *in vitro* рекомбинантных форм IL-3, IL-5 и эотаксина установлено снижение функционального потенциала эозинофильных гранулоцитов в отношении экспрессии IL-3R и IL-5R при неизменной способности эозинофилов презентировать рецептор к эотаксину. Кроме этого, у всех пациентов с гемобластозами, ассоциированными с синдромом эозинофилии, было выявлено напряжение кислороднезависимых и кислородзависимых процессов микробицидности, что обуславливает формирование высокого цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов.

Следует отметить, что при проведении сравнительного анализа результатов исследования у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися эозинофилией, в зависимости от половых и возрастных критериев, а также факта наличия полихимиотерапии в анамнезе достоверных различий тестируемых показателей выявлено не было.

Таким образом, избыточная продукция цитокинов, являющихся ключевыми в регуляции процессов клеточного гомеостаза эозинофилов, мононуклеарными лейкоцитами, с одной стороны, и дисбаланс экспрессии рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов, с другой, на наш взгляд, могут обуславливать нарушение кооперации изученных клеток и являться одним из механизмов, лежащих в основе пролонгированного пребывания эозинофилов в периферической крови при лимфогранулематозе, множественной миеломе и неходжкинских лимфомах. Выявленное нами увеличение цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов, действие которого может реализоваться не только в отношении антигенных структур, но и клеток макроорганизма, позволяет сделать предположение о негативном влиянии длительной эозинофилии крови, сопровождающей гемобластозы (рис. 5).

Анализ молекулярных механизмов цитокин-рецепторной кооперации иммунокомпетентных клеток и эозинофильных гранулоцитов значим не только с точки зрения вскрытия их природы. Он важен для понимания патогенеза

лимфопролиферативных заболеваний системы крови (лимфогранулематоз, множественная миелома и неходжкинские лимфомы), приводит к усилению цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов.

4. Механизмы формирования синдрома эозинофилии при лимфогранулематозе, множественной миеломе и неходжкинских лимфомах сопряжены с нарушением кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов, опосредованной цитокинами, регулирующими процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофильных клеток.

5. Нарушение кооперации эозинофилов и мононуклеарных клеток у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, ассоциированными с синдромом эозинофилии, связано с повышением продукции мононуклеарами IL-3, IL-5 и GM-CSF и увеличением уровня эотаксина в сыворотке крови при возрастании экспрессии эозинофилами комплементарных им рецепторов (IL-3R, IL-5R и CCR3) в условиях дефицита T-клеточного звена иммунной системы и сниженной секреции IL-4 мононуклеарными лейкоцитами периферической крови.

6. При дополнительном воздействии на эозинофильные клетки, полученные у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающимися развитием синдрома эозинофилии, *in vitro* рекомбинантных форм IL-3, IL-5 и эотаксина снижается функциональный потенциал эозинофильных гранулоцитов в отношении экспрессии IL-3R и IL-5R при неизменной способности эозинофилов презентировать рецептор к эотаксину.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова Л.С., Колобовникова Ю.В., Рязанцева Н.В. Иммунорегуляторная роль интерлейкина-4 при гемобластозах // Тезисы докладов Международного конгресса «Иммунитет и болезни: от теории к терапии», Москва, 2005. - С. 170.
2. Изменение продукции IL-4 иммунокомпетентными клетками при хроническом описторхозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, Н.В. Рязанцева, А.П. Зима, О.Б. Жукова // Тезисы докладов I Съезда физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека», Сочи, 2005. – С. 118 - 119.
3. Механизмы нарушения кооперации эозинофилов и иммуноцитов при формировании больших эозинофилий крови / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. - №2. – С. 52 – 61.
4. Цитотоксический потенциал эозинофильных гранулоцитов у больных с синдромом эозинофилии / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.Н. Кнутарева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. - №3. – С. 26 – 31.
5. Цитокины и противовирусный иммунитет / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, В.В. Белоконь, А.П. Зима, О.Б. Жукова, И.О. Наследникова, Л.С.

Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Н.Ю. Часовских // Успехи физиологических наук. – 2006. - Т. 137, №4. – С. 1 – 11.

6. Изменение продукции эозинофилстимулирующих цитокинов иммунокомпетентными клетками при описторхозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, О.Б. Жукова, Н.П. Чернышова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Вестник уральской медицинской академии наук. - 2006. – Т.3, №1. - С. 139 – 141.

7. Особенности противопаразитарной реактивности организма при описторхозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева // Тезисы докладов 5-й научно-практической конференции с международным участием «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины», Астрахань, 2006. - С. 142 – 144.

8. Изменение продукции Th2-цитокинов мононуклеарными клетками при множественной миеломе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.Н. Кнутарева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, Н.В. Рязанцева // Тезисы докладов VIII Конгресса «Паллиативная медицина и реабилитация в здравоохранении», Москва, 2006. - С. 19.

9. Изменения иммунологической реактивности при лимфогранулематозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, Н.В. Рязанцева // Тезисы докладов XII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 2006. - С. 53 – 54.

10. Изменение уровня продукции IL-5 иммунокомпетентными клетками при злокачественных заболеваниях системы крови, сопровождающихся синдромом эозинофилии / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, О.Б. Жукова // Тезисы докладов Российского медицинского форума-2006 «Фундаментальная наука и практика», Москва, 2006. - С. 88.

11. Механизмы нарушения цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и иммунцитов при формировании феномена эозинофилии / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, С.Б. Ткаченко, Ю.В. Колобовникова Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Иммунология. – 2007. - №2. - С. 123 – 127.

12. Цитокинопосредованные механизмы формирования синдрома эозинофилии при гемобластозах / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.Н. Кнутарева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Бюллетень сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. – 2007. - №2. – С. 153 - 159.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

КОЕ – колониеобразующая единица

НСТ – нитросиний тетразолий

СЦК – средний цитохимический коэффициент

ФГА – фитогемагглютинин

CD – поверхностный кластер дифференцировки

CSF - колониестимулирующий фактор

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

Ig - иммуноглобулин

IL – интерлейкин

Th – Т-хелперы

TNF - фактор некроза опухоли