

На правах рукописи

Литвинова Лариса Сергеевна

**МЕХАНИЗМЫ ДИЗРЕГУЛЯЦИИ КООПЕРАЦИИ
ЭОЗИНОФИЛОВ И ИММУНОЦИТОВ ПРИ БОЛЬШИХ
ЭОЗИНОФИЛИЯХ КРОВИ**

14.00.16 – патологическая физиология
03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора 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 консультанты:

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 Степовая Елена Алексеевна, профессор биохимии и молекулярной биологии ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН Дыгай Александр Михайлович, заместитель директора по НИР ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН Шкурупий Вячеслав Алексеевич, директор ГУ НЦ клинической и экспериментальной медицины СО РАМН

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

Автореферат разослан «___» _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Гиперэозинофильная реакция крови сопровождает течение многочисленной группы нозологических форм и синдромов, имеющих разные механизмы развития, прогноз и исход [Коровина Н.А. и соавт., 2002; Чучалин А.Г., 2003; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005].

Явление пролонгированного пребывания эозинофильных клеток в периферической крови привлекает интерес многих исследователей в связи с ключевой ролью этих клеток в реализации патогенеза аллергических заболеваний и паразитарных инвазий, где они выступают в роли эффекторных клеток и факторов защиты, предотвращая генерализацию иммунного ответа и обеспечивая эффективную элиминацию инфектогенов паразитарной природы [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]. В современной литературе появляется множество работ, свидетельствующих об участии эозинофильных гранулоцитов в реализации противоопухолевого иммунитета как звена неспецифической резистентности врожденного иммунитета [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Мокеева Р.А. и соавт., 2000; Воробьев А.И., 2003; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004; Caruso R.A. et al., 2004; Ольшанская Ю.В. и соавт., 2005; Абдулкадыров К.М., 2006].

Накопленные к настоящему времени в мировой литературе многочисленные сведения, касающиеся особенностей эозинофильного гомеостаза в норме и при реализации патологического процесса, свидетельствуют, что, с одной стороны, эозинофил является одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток воспаления, а с другой, - выступает как важный фактор поддержания тканевого и иммунологического гомеостаза, принимая участие в регуляции функций иммунокомпетентных клеток, процессах фагоцитоза, клеточной репарации, свертывания крови 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]. Рассмотрение вопроса о переосмыслении физиологической роли эозинофилов продиктовано прежде всего фактическими данными о взаимодействии эозинофильных гранулоцитов с иммунокомпетентными клетками макроорганизма.

В настоящее время одним из наиболее развивающихся направлений биомедицинских исследований становится изучение молекулярных механизмов нарушений кооперативных взаимодействий эффекторных клеток в патогенезе различных заболеваний. Очевидно, что межклеточная кооперация, осуществляя ключевую роль в регуляции гомеостаза клеток, определяет направление их дифференцировки, а также реализацию многих эффекторных клеточных функций [Ярилин А.А., 1999; Иванов А.А. и соавт., 2005]. Важную роль в становлении и стабилизации контактов между взаимодействующими клетками макроорганизма играет цитокин-рецепторная сеть. Посредством цитокинов, синтезируемых и секретируемых клеткой, осуществляются лиганд-рецепторные

взаимодействия за счет связывания растворимых веществ с аффинным рецептором на клеточной поверхности [Ярилин А.А., 2001; Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2002, 2004]. 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 [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]. В свою очередь дисрегуляция функционирования компонентов, составляющих основу межклеточной кооперации, может обуславливать нарушение процессов созревания, активации и реализации программированной гибели эозинофильных гранулоцитов и приводить к длительному пребыванию последних в периферической крови.

В целом, исследования последних лет показали, что, несмотря на повышенный интерес исследователей к этой проблеме и большое количество экспериментальных и клинических работ, в настоящее время механизмы и целесообразность развития эозинофилии крови при патологических процессах разного генеза изучены недостаточно, а имеющиеся в современной литературе данные носят весьма неоднозначный характер и касаются, в основном, лишь клинической стороны вопроса.

Цель исследования: установить механизмы нарушения кооперативного взаимодействия иммуноцитов и эозинофилов при заболеваниях, сопровождающихся развитием эозинофилии крови.

Задачи исследования:

1. Дать комплексную оценку морфофункциональных свойств эозинофильных гранулоцитов периферической крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у больных описторхозом, ассоциированных с эозинофилией крови.
2. Оценить роль дисбаланса эозинофилспецифичных цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF и эотаксина), регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофильных клеток, в механизмах нарушения межклеточной кооперации при заболеваниях, сопровождающихся формированием эозинофилии крови (лимфопролиферативные заболевания системы крови и описторхоз).
3. Выявить механизмы нарушения цитокиноопосредованной кооперации эозинофилов и иммуноцитов при заболеваниях, осложненных формированием эозинофилии крови (лимфопролиферативные заболевания системы крови и описторхоз).
4. Оценить роль нарушений апоптотической гибели эозинофилов в механизмах развития большой эозинофилии крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и гельминтозе, обусловленном *O.felineus*.
5. Установить общие закономерности и особенности реализации механизмов кооперации эозинофилов и иммуноцитов при формировании большой

эозинофилии крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозе.

Научная новизна. Впервые с привлечением широкого комплекса современных гематологических, иммунологических и молекулярно-биологических методов исследования представлены фундаментальные механизмы формирования эозинофильной реакции крови при патологических процессах разного генеза с позиций нарушения кооперативного взаимодействия иммуноцитов и эозинофилов.

Впервые обосновано, что у пациентов с гемобластозами (лимфогранулематоз, множественная миелома и неходжкинские лимфомы) и у больных описторхозом (острая и хроническая формы), сопровождающихся гиперэозинофилией крови, нарушен морфофункциональный статус эозинофильных гранулоцитов (изменены морфометрические характеристики ядра и цитоплазмы, увеличено содержание внутриклеточных катионных протеинов и активность пероксидазы, усилена фагоцитарная активность, клетки имеют признаки дегрануляции и цитолиза).

Показано, что при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и гельминтозе, обусловленном паразитированием *O.felineus*, ассоциированных с развитием эозинофильной реакции крови, интенсификация процессов, опосредующих реализацию кислороднезависимых и кислородзависимых механизмов микробицидности, приводит к формированию высокого цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов, что может обуславливать негативное влияние длительной гиперэозинофилии крови на течение основной патологии.

Впервые установлено, что механизмы развития эозинофилии, осложняющей течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови и описторхоза, сопряжены с изменением кооперативного взаимодействия эозинофильных гранулоцитов и мононуклеарных клеток. Данное положение подтверждается фактом обнаружения повышенной продукции мононуклеарами эозинофилспецифичных медиаторов (IL-3, IL-5, IL-4 и GM-CSF) и увеличением уровня эотаксина в сыворотке крови с возрастанием на эозинофилах презентации мембранноассоциированных рецепторов к IL-3, IL-5 и эотаксину. Получены новые данные, свидетельствующие о снижении резервной способности эозинофильных гранулоцитов презентировать рецепторы к IL-3 и IL-5 при инкубации клеток *in vitro* с рекомбинантными формами одноименных цитокинов.

Установлен факт угнетения апоптоза эозинофилов при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозной инфекции. Приоритетными являются данные о роли нарушений цитокиноопосредованной программированной гибели эозинофилов в патогенезе больших эозинофилий крови. Результаты экспериментальных исследований *in vitro* свидетельствуют, что при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови на фоне низких значений базального апоптоза эозинофильных клеток, дополнительное воздействие на них рекомбинантных форм цитокинов, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов (IL-3, IL-5 и

эотаксина), не оказывает влияния на их запрограммированную гибель, что свидетельствует о неадекватности восприятия эозинофилами антиапоптотических сигналов при данной патологии. У пациентов с гельминтозом, обусловленном паразитированием *O.felineus*, напротив, в эксперименте *in vitro* продемонстрирована повышенная чувствительность эозинофильных клеток к антиапоптотическому действию IL-3, IL-5 и эотаксина. Наряду с этим *in vitro* в условиях дефицита ростовых факторов показана повышенная чувствительность эозинофилов, полученных у пациентов с большими эозинофилиями крови, к действию проапоптотических факторов.

Теоретическая и практическая значимость. Впервые установлены закономерности нарушения кооперации эозинофилов и иммуноцитов в механизмах развития больших эозинофилий крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозной инвазии. Определена важная роль в этом процессе ключевых цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF и эотаксина), регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов и их рецепторов (IL-3, IL-5, CCR3), нарушений лиганд-рецепторного взаимодействия и цитокинопосредованной регуляции апоптоза эозинофильных гранулоцитов. Продемонстрирован факт выраженного нарушения морфофункционального статуса эозинофильных гранулоцитов при нозологиях, сопряженных с формированием эозинофилии.

Положения исследования могут служить основанием для формирования стратегии изучения молекулярных и клеточных механизмов развития синдрома гиперэозинофилии при различных заболеваниях. Полученные фундаментальные знания могут быть положены в основу разработки технологии коррекции дисрегуляции кооперативного взаимодействия эозинофилов и иммунокомпетентных клеток при патологических процессах разного генеза, ассоциированных с формированием эозинофилии крови, с целью проведения патогенетически обоснованной терапии иммунных нарушений и своевременной профилактики осложнений, возникающих при длительной гиперэозинофилии.

Положения, выносимые на защиту:

1. При злокачественных заболеваниях системы крови (лимфогранулематоз, множественная миелома и неходжинские лимфомы) и описторхозе (острая и хроническая формы), ассоциированных с гиперэозинофильной реакцией крови, гранулоциты эозинофильного ряда претерпевают однотипные нарушения морфофункциональных свойств, обуславливающих формирование их высокого микробицидного потенциала.
2. Патогенез больших эозинофилий крови, сопровождающих течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови и описторхоза, сопряжен с нарушением цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов.
3. Механизмы нарушения кооперации эозинофилов и мононуклеарных клеток при эозинофилии, сопровождающей течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови и описторхозной инвазии, опосредованы повышением продукции мононуклеарными клетками ключевых в регуляции

гомеостаза эозинофильных клеток цитокинов (IL-3, IL-5, GM-CSF и эотаксина) и нарушением баланса экспрессии эозинофилами комплементарных им рецепторов (IL-3R, IL-5R и CCR3).

4. Существенный вклад в формирование гиперэозинофильной реакции крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозе вносит нарушение реализации цитокинопосредованной апоптотической гибели эозинофилов.

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), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Социально-экологические проблемы природопользования в Центральной Сибири" (Красноярск, 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), VIII Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении» (Санкт-Петербург, 2007), XI-м Всероссийском научном форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (Санкт-Петербург, 2007), XIII-ой межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии - 2007» (Санкт-Петербург, 2007).

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом при Президенте РФ для ведущих научных школ РФ по проблеме «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) и «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 на 2002-2006 годы».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы, из них 9 статей в ведущих рецензируемых журналах и изданиях, определенных ВАК РФ, одна монография в соавторстве, 13 статей и тезисов в материалах конференций, конгрессов и съездов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 275 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 43 таблицами. Библиографический указатель включает 452 источника (167-отечественных и 285 - иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу настоящей работы положены результаты комплексного клинико-лабораторного обследования 246 человек (115 мужчин и 131 женщин в возрасте от 18 до 60 лет, средний возраст – 34 ± 3 лет). 130 больных (59 мужчин и 71 женщина в возрасте от 18 до 60 лет) страдали злокачественными заболеваниями системы крови (из них 97 пациентов с первичным обращением в стационар по поводу лимфопролиферативных заболеваний системы крови и 33 пациента, находящихся на диспансерном учете и ранее получавших от 2 до 6 курсов полихимиотерапии (не менее чем 1-3 года назад)). Все пациенты с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови были обследованы до назначения терапии при поступлении в отделение гематологии Томской областной клинической больницы (главный врач – Заслуженный врач РФ Б.Т. Серых). У 116 человек (56 мужчин и 60 женщин в возрасте от 18 до 60 лет) был верифицирован диагноз описторхоза. Набор этого клинического материала проводился в инфекционном отделении госпитальных клиник ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (главный врач – Заслуженный врач РФ к.м.н. В.М. Шевелев, заведующая отделением – к.м.н., 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.м.н., профессора А.В. Лепехина и врача-ординатора клиники инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава к.м.н. Н.П. Чернышовой. В контрольную группу были включены 40 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту (22 мужчины и 18 женщин в возрасте от 18 до 60 лет, средний возраст – 28 ± 4 лет). Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, инфекционная патология, а также злоупотребление алкоголем и наркотическая зависимость.

Все больные со злокачественными заболеваниями системы крови, ассоциированными с эозинофилией, 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 (по МКБ-10 рубрика С90.0): их них 28 человек – с диффузно-очаговой формой миеломных инфильтратов, 2 – с диффузной формой миеломных инфильтратов. Диагноз миеломной болезни устанавливался на основании обнаружения плазмноклеточной 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.

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

Все обследованные пациенты с описторхозом были разделены на две группы. В первую группу были включены 46 лиц, страдающих острым описторхозом (по МКБ-10 рубрика В66), подавляющее большинство которых составили новоселы Томской области (40 человек): из них 29 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 периферической крови (эозинофилия (>15%), лейкоцитоз). Обязательным для постановки диагноза острого описторхоза у обследованных пациентов являлось обнаружение IgM-антител к антигенам *O.felineus* в сыворотке крови с применением иммуноферментного анализа.

Согласно классификации описторхоза М.Э. Винникова и соавт. [1969, 1971] и Н.Н. Озерецковской [2000], были выделены следующие клинические группы: 1) пациенты с тифоподобным вариантом течения инфекции – 16

человек; 3) пациенты с гепато-холангитическим вариантом течения – 20 человек; 4) пациенты с гастроэнтерологическим вариантом течения – 10 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 36% 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 правого подреберья, 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 50 больных хроническим описторхозом с выраженной клинической картиной (реинвазия, суперинвазия) (по МКБ-10 рубрика В-66). Верификацию диагноза проводили на основании данных клинко-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 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 - 30 пациентов; 2) больные холангиохолециститом – 16 человек; 3) больные гепатопанкреатитом - 4 человека.

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 49%, 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

15 %; артралгический синдром регистрировался у 27% больных. Группу сравнения составили 20 пациентов с хроническим описторхозом без эозинофилии крови с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. Распределение здоровых доноров и обследованных пациентов по группам в соответствии с использованными методами исследования представлено в таблице.

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].

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови по CD-маркерам (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD22⁺) проводили иммуноцитохимическим методом [Тотолян А.Н. и соавт., 2002]. Результаты выражали в процентных и абсолютных значениях.

Мононуклеары выделяли в стерильных условиях из цельной венозной крови методом градиентного центрифугирования с использованием Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077$ г/см³). 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 [Хайтов 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 проводили 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 морфофункционального статуса эозинофильных гранулоцитов с использованием цитохимических методов исследования. Содержание неферментных катионных протеинов в эозинофилах периферической крови определяли цитохимическим методом М.Г. Шубича

	Здоровые доноры	Пациенты со злокачественными заболеваниями системы крови	Пациенты с описторхозом
Определение показателей лейкоцитарного звена периферической крови (общего количества лейкоцитов, абсолютного и относительного содержания эозинофилов и лимфоцитов)	40	130	116
Определение содержания лизосомальных катионных белков и пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах цитохимическим методом	38	93	96
Определение фагоцитарной активности эозинофилов периферической крови в НСТ-тесте	40	85	70
Оценка морфометрических характеристик ядра и цитоплазмы эозинофильных гранулоцитов методом компьютерной морфометрии	25	75	50
Определение особенностей морфологии эозинофилов в среде с антигеном <i>O.felineus</i>	30	75	50
Определение количества лимфоцитов крови, презентующих CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD8 ⁺ и CD22 ⁺ -маркеры иммуноцитохимическим методом	35	80	60
Исследование содержания (IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF) эозинофилстимулирующих цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и уровня эотаксина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	20	60	45
Оценка количества эозинофилов, несущих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину, методом лазерной проточной цитофлуориметрии	20	45	30
Оценка реализации апоптоза в аннексиновом тесте с использованием лазерной проточной цитофлуориметрии			
• Исследование спонтанного апоптоза эозинофилов периферической крови	10	45	30
• Модуляция апоптоза in vitro:			
- лишением ростовых факторов	10	45	30
- добавлением рекомбинантных форм цитокинов (IL-5, IL-3, eotaxin)	10	45	30

Таблица

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

[Меньшиков В.В., 1987] (рис. 1а). Оценивали активность пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах методом Грэхема-Кнолля [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983] (рис. 1б). 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] (рис. 1в).

Исследование морфометрических характеристик эозинофильных гранулоцитов осуществляли с помощью метода компьютерной морфометрии [Автандилов Г.Г., 1990; Ильинских Н.Н. и соавт., 2005] с использованием программы «ImageJ» (проект, реализованный национальным институтом здоровья США) (Автор - Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) (рис. 2).

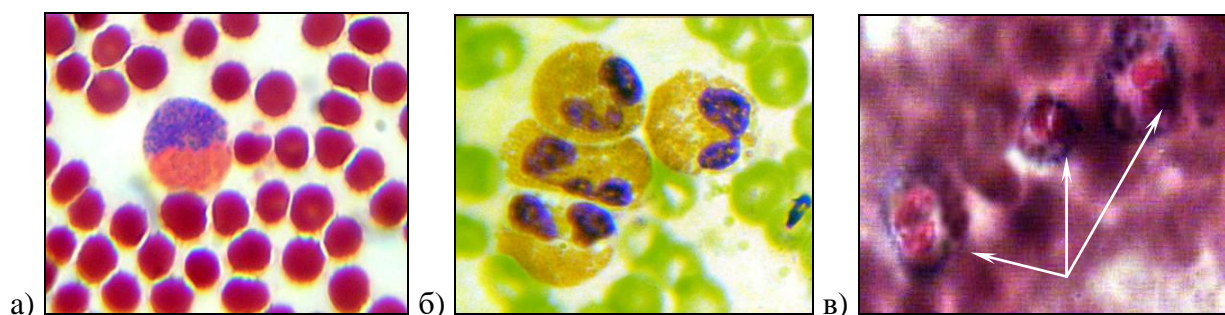


Рис. 1. Содержание внутриклеточных эозинофильных катионных протеинов (а) и пероксидазы (б) в эозинофилах периферической крови. Диформазан-позитивные эозинофилы (в)

В рамках диссертационной работы проводили оценку состояния рецепторного аппарата эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, сопровождающихся 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% CO_2 . 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 флуоресцентными 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) (рис. 3).

Регистрация апоптоза была основана на определении экспрессии на поверхности клеток фосфатидилсерина. Для его обнаружения использовался FITC-меченный аннексин V, который обладает сродством к фосфатидилсерину [Van England et al., 1998]. Выделенные в стерильных условиях эозинофилы

периферической крови культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в объеме 200 мкл. В лунки вносили суспензию клеток ($2 \cdot 10^5$ на лунку), а также полную культуральную среду, состоящую из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), инактивированной при 56°C в течение 30 мин, 0,3 мг/мл L-глутамина. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO_2 . После отмывания клетки суспензировали ($1 \cdot 10^6$ в 1 мл) в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченный FITC, и через 15 мин подвергали проточной цитофлуориметрии как описано выше. В гейте эозинофильных клеток анализировали наличие зеленой флуоресценции FITC на одномерной гистограмме (рис. 3).



Рис. 2. Данные компьютерной морфометрии: а) выбор объекта для морфометрического исследования, б) выделение площади эозинофильной клетки, в) выделение ядра эозинофила, г) выделение гетерохроматиновых областей ядра эозинофила, д) выделение эухроматиновых участков ядра эозинофила с использованием метода кластерного анализа. Окраска азури II-эозином, увеличение 900

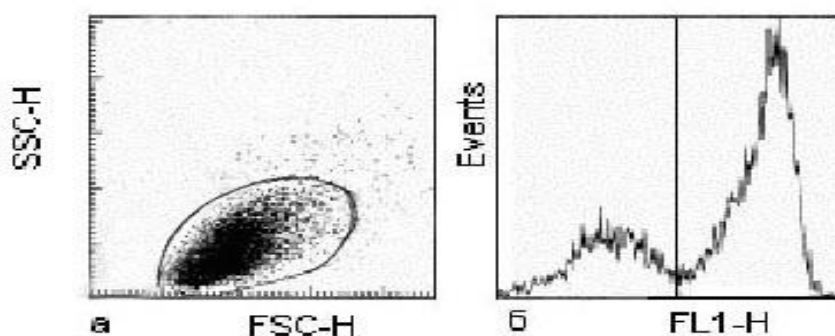


Рис. 3. Гистограмма распределения эозинофилов по интенсивности флуоресценции в FL1-канале. Оценка содержания $IL-5R^+$ -клеток, меченных FITC, в гейте эозинофильных гранулоцитов

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

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

В рамках диссертационной работы проводили оценку реализации апоптоза эозинофилов периферической крови у пациентов с

лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у лиц, страдающих описторхозом, сопровождавшимися эозинофилией крови, а также у здоровых доноров *in vitro* в условиях инкубации эозинофильных клеток в среде, лишенной ростовых факторов и с рекомбинантными формами эозинофилспецифичных цитокинов (IL-3, IL-5 и эотаксин). Для этого в лунки планшета вносили суспензию выделенных эозинофилов крови ($2 \cdot 10^5$ на лунку), а также чистую среду RPMI-1640 без эмбриональной телячьей сыворотки, т.е. в отсутствии ростовых факторов, или полную культуральную среду с добавлением рекомбинантных (r) IL-3 (r-IL-3) («Biosource», Бельгия), r-IL-5 («Biosource», Бельгия) и r-eotaxin («Biosource», Бельгия) в концентрации 10^{-8} г/мл. Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5% CO₂. Затем с помощью FITC-меченного аннексина V методом проточной лазерной цитометрии регистрировали апоптоз как указано выше (рис. 3).

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Шапиро-Вилка). Для нормально распределенных выборок вычисляли средневывборочные характеристики: среднее арифметическое (\bar{X}), среднее квадратичное отклонение (σ), ошибка среднего (m). Для выборок, распределение которых отличалось от нормального, рассчитывали медиану (Me), первый и третий квартили (Q_1 , Q_3). При соответствии нормальному закону распределения признака в исследованных 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 исследованных группах применяли критерий Манна Уитни для независимых групп. Различие двух сравниваемых величин считали достоверным при уровне значимости $p < 0,05$. С целью обнаружения связи между исследованными показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Методом множественной регрессии был рассчитан коэффициент β , определяющий степень зависимости между исследованными показателями [Гланц С., 1999; Боровиков В.П., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день проблемы, касающиеся аспектов формирования эозинофилии крови при патологических процессах разного генеза, относятся к актуальным задачам современной медицины. Это связано как с весьма высокой встречаемостью данного феномена, так и с возможностью развития опасных

осложнений, опосредованных реализацией цитотоксического потенциала эозинофильных гранулоцитов [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Воробьев А.И. и соавт., 2000; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Чучалин А.Г., 2003; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004]. В последнее время становится очевидным, что изучение реализации патогенеза преобладающего числа заболеваний и синдромов с позиций оценки межклеточной кооперации эффекторных клеток, к которым с полным основанием можно отнести клетки крови, может привести ясность в вопросы формирования тех или иных патологических процессов, а также предложить стратегию для разработки универсальных патогенетически обоснованных методов их коррекции. Данное положение послужило основным посылом к выполнению настоящего исследования, направленного на установление ключевых механизмов нарушений кооперативного взаимодействия иммунцитов и эозинофилов при заболеваниях, ассоциированных с развитием эозинофильной реакции крови (лимфопролиферативные заболевания системы крови и гельминтоз, обусловленный *O.felineus*). Наше внимание было сфокусировано на оценке морфофункционального статуса эозинофильных гранулоцитов; выявлении иммунофенотипических свойств иммунокомпетентных клеток и их способности к продукции ключевых эозинофилспецифичных медиаторов, регулирующих гомеостаз эозинофильных клеток; исследовании особенностей рецепторэкспрессирующей функции эозинофилов; установлении характера изменения их программированной гибели и степени вовлеченности в спонтанный и индуцированный цитокинами апоптоз эозинофилов в условиях *in vitro*, полученных у пациентов с гиперэозинофилией крови.

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.

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, согласуются с данными литературы, указывающими на развитие феномена эозинофилии при описторхозной инвазии и злокачественных заболеваниях системы крови, что характеризовалось значительным увеличением (по сравнению с нормой) содержания эозинофилов в крови (до $25,79 \pm 4,29\%$, $p=0,003$ - у пациентов с лимфогранулематозом; $16,86 \pm 2,63\%$, $p=0,014$ - множественной миеломой; $15,18 \pm 2,66\%$, $p=0,042$ - неходжкинскими лимфомами; $45,43 \pm 8,71\%$, $p=0,001$ - острым описторхозом и $19,51 \pm 1,76\%$, $p=0,019$ - хроническим течением гельминтоза (реинвазия, суперинвазия) при норме $2,18 \pm 0,06\%$).

Общеизвестно, что в реализации противопаразитарного иммунитета лейкоциты эозинофильного ряда играют особую роль. Повышенное содержание эозинофилов является одним из первых, а иногда и единственным признаком сенсibilизации макроорганизма антигенами *O.felineus* [Бронштейн А.М., 1997; Сергиев В.П. и соавт., 1997; Токмалаев А.К., 2002]. Формирование эозинофильной реакции крови при описторхозной инвазии опосредовано

антителозависимым хемотаксисом эозинофильных гранулоцитов (опосредованный IgE- или IgG-антителами) [Гриншпун Л.Д., 1989; Озерецковская Н.Н., 2000], который имеет защитную функцию, опосредуя эффективный киллинг эозинофилами инфектогенов паразитарной природы [Воробьев А.И., 2002]. Установлено, что высокая эозинофилия (>50%) крови при развитии острой фазы описторхоза является специфическим маркером миграционной стадии гельминтоза, когда паразитарный инфектоген находится в тесном соприкосновении с тканями макроорганизма [Гриншпун Л.Д., 1983; Беклемишев И.Д., 1998; Джальчинова В. Б., Чистяков Г. М., 1999; Озерецковская Н.Н., 2000].

В последнее время исследователи уделяют все большее внимание проблеме хронического описторхоза, поскольку именно эта стадия заболевания характеризуется системным действием возбудителя на организм [Лепехин А.В., 1992; Карбышева Н.В., 2001; Карапетян М.С., 2003]. Согласно данным современной литературы, эозинофилия крови при хроническом описторхозе развивается всего в 44,0%-59,3% случаев [Лепехин А.В., 1992; Карбышева Н.В., 2001; Ильинских Е.Н. и соавт., 2002]. Наше исследование также подтверждает формирование эозинофилии периферической крови лишь у 60% обследованных нами пациентов с хроническим течением описторхоза (реинвазия, суперинвазия). Данное обстоятельство многие авторы связывают с повышенной миграцией эозинофильных гранулоцитов в область пребывания гельминтов и способностью формировать там инфильтраты. Так, эозинофилы обладают способностью фиксироваться в различных тканях и органах, обуславливая развитие «эозинофильного воспаления» с последующим повреждением и фиброзированием окружающих тканей (эозинофильная пневмония, эозинофильные васкулиты, эозинофильные гастроэнтериты и др.) [Pungpak S. et al., 1989; Карбышева Н.В., 2001; Карапетян М.С., 2003; Pauly A. et al., 2003].

Частота обнаружения эозинофилий при опухолевых заболеваниях различной локализации по данным А.И. Воробьева [2002] достаточно низкая (0,54% среди всех случаев). Однако рост количества эозинофилов в крови является весьма частым спутником злокачественной патологии системы крови. В гематологической практике врачи нередко сталкиваются с проблемой интерпретации причин развития эозинофилии у больных гемобластозами, происходящими из клеток-предшественниц лимфо- и миелопоэза [Merz H. et al., 1991; 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]. Некоторые авторы отмечают, что данный гематологический синдром имеет большое диагностическое значение, являясь одним из ранних симптомов начальной стадии опухолевой прогрессии [Гриншпун Л.Д., 1983; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005; Поддубная И.В. и соавт., 2006].

Очевидно, что механизмы формирования различных заболеваний и синдромов, в том числе гематологических, тесно сопряжены с морфо-функциональным дисбалансом тех или иных эффекторных клеток [Автандилов Г.Г., 1990; Анаев Э.Х. и соавт., 2002; Ильинских Е.Н. и соавт., 2005]. В ходе проведенного нами анализа цифровых скенограмм эозинофильных

гранулоцитов, полученных от лиц с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у больных описторхозом, ассоциированных с эозинофилией крови, с помощью метода компьютерной морфометрии, нами было выявлено значимое (по сравнению с нормой) увеличение размеров изученных клеток у всех категорий обследованных пациентов вне зависимости от нозологии, о чем свидетельствовал рост показателей, отражающих значения общей площади клетки (площадей ядра и цитоплазмы), а также периметра эозинофильных гранулоцитов (у пациентов с лимфогранулематозом значения площади эозинофильных клеток составили $178,01 \pm 9,22$ мкм² ($p=0,018$); множественной миеломой - $159,31 \pm 7,41$ мкм² ($p=0,036$); неходжкинскими лимфомами - $165,21 \pm 10,21$ мкм² ($p=0,025$); острым описторхозом - $169,10 \pm 7,02$ мкм² ($p=0,010$) и хроническим течением данного гельминтоза - $157,01 \pm 9,02$ ($p=0,023$) при норме $132,80 \pm 13,11$ мкм²).

Возможно, что одним из основополагающих механизмов зафиксированного нами изменения размеров эозинофильных клеток при рассматриваемых нозологиях, ассоциированных с повышением числа эозинофилов, может быть приобретение последними гиподенсного фенотипа [Simon D. et al., 1982; Prin L. et al., 1983, 1984; Peters B. et al., 1989; Gleich G.J., Leiferman K.M., 2005]. Показано, что субпопуляцию низкоплотных эозинофилов характеризуют более крупные размеры клеток и повышенная вакуолизация цитоплазмы [Анаев Э.Х., и соавт., 1994. 2002]. Кроме того, эозинофилы со сниженной плотностью обладают большей функциональной и метаболической активностью, что находит отражение в интенсификации их окислительного метаболизма, увеличении транспорта гексозы, повышении синтеза биологически активных веществ и т.д. [Winqvist G. et al., 1982; Prin L. et al., 1984; Frick T. et al., 1988; Черногорюк Г.Э., 2002]. Небезынтересно отметить, что при гемобластозах и описторхозной инвазии, сопровождающихся эозинофилией крови, также регистрировалось статистически значимое снижение (по сравнению с нормой) значений циркулярности (в среднем в 1,8 раз) и, напротив, увеличение (в среднем в 5,5 раз) количества инвагинаций плазматической мембраны эозинофилов.

При исследовании показателей, характеризующих состояние ядра эозинофильных гранулоцитов, у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и острым описторхозом, ассоциированных с эозинофилией крови, обращало на себя внимание увеличение значений ядерных площадей эозинофилов и ядерно-цитоплазматического индекса по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (соответственно $84,44 \pm 7,19$ мкм², $p=0,023$ и $0,91 \pm 0,01$, $p=0,017$ – у больных лимфогранулематозом; $79,16 \pm 4,56$ мкм², $p=0,029$ и $0,95 \pm 0,01$, $p=0,017$ – множественной миеломой; $80,89 \pm 6,32$ мкм², $p=0,031$ и $0,94 \pm 0,03$, $p=0,027$ – неходжкинскими лимфомами и $81,04 \pm 6,09$ мкм², $p=0,009$ и $0,096 \pm 0,01$, $p=0,021$ – острым описторхозе при норме $55,4 \pm 3,04$ мкм² и $0,72 \pm 0,01$). Установление данного факта может свидетельствовать об интенсификации процессов эозинофилопоэза в костном мозге при вышеуказанных нозологиях [Ильинских

Н.Н., 2005]. При хроническом описторхозе площадь ядер эозинофильных гранулоцитов и значения ядерно-цитоплазматического индекса варьировали в пределах нормальных значений ($p=0,077$ и $p=0,054$).

Согласно современным представлениям, реализация генетической информации, выражающаяся в синтезе разнообразных молекул, связана с изменением структуры ядерных компонентов: степень выраженности компактизации хроматина коррелирует с долей активированного генетического материала, что, в свою очередь, детерминирует функциональную активность клетки [Автандилов Г.Г., 1973, 1984, 1990; Ильинских Н.Н. и соавт., 2005]. У обследованных нами лиц с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови вне зависимости от нозологии отмечалось значимое увеличение (по сравнению с нормой) относительной площади эухроматиновой зоны ядер эозинофилов (в 2 раза) на фоне сниженных значений гетерохроматинового кластера (в среднем на 27%), что может служить индикатором повышения транскрипционной активности и интенсивности синтетических процессов в ядерных структурах изученных клеток. При остром и хроническом течении гельминтоза, вызванном паразитированием *O.felineus*, напротив, регистрировалось достоверное увеличение (по сравнению с контролем) участков гетерохроматиновых зон в ядрах эозинофилов (в среднем в 1,8 раз, $p=0,015$ и $p=0,011$) при соответствии показателей эухроматиновой зоны нормальным значениям ($p=0,120$ и $p=0,098$), что может указывать на замедление или «инертность» реализации вышеуказанных процессов. Данное обстоятельство многие авторы связывают с гиперантигемией, развивающейся при описторхозной инвазии и присутствием в плазме генотоксических агентов [Fedorov K.P. et al., 2002; Pauly A. et al., 2003; Falcone F.H. et al., 2004].

Не вызывает сомнения тот факт, что адекватное функционирование клеток макроорганизма во многом определяется полноценностью их структур [Гриншпун Г.Д., Виноградова Ю.Е., 1983; Воробьев А.И., 2002]. Эозинофилия, сопутствующая течению патологических процессов разного генеза, весьма часто сопровождается существенными изменениями морфологических свойств эозинофилов, что может проявляться усилением их способности к дегрануляции и цитолизу [Анаев Э.Х. и соавт., 1997; Ружицкая Е.А. и соавт., 2000]. Это положение подтверждается результатами наших исследований, выявивших значительное увеличение (по сравнению с нормой) содержания эозинофилов, полученных у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у пациентов с описторхозом, ассоциированных с эозинофилией крови, с измененной морфологией ядра и цитоплазмы в спонтанной (без антигенной стимуляции) и индуцированной (инкубация с очищенными фиксированными иммунодоминантными фракциями белков *O.felineus*) пробах (у лиц с лимфогранулематозом, множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами, количество морфологически измененных эозинофилов в пробах без антигенной стимуляции превышало аналогичные значения нормы в среднем в 3,3 ($p=0,025$, $p=0,03$ и $p=0,036$), в условиях инкубации с антигенами *O.felineus* - в 4,1 раз ($p=0,023$, $p=0,029$ и $p=0,033$); у больных острым и хроническим течением описторхоза - в 3,4 ($p=0,001$ и

$p=0,008$) и в 4,2 ($p=0,023$ и $p=0,049$) раза, соответственно). При этом рассчитанный показатель повреждения эозинофилов [Нишева Е.С. и соавт., 1995] у всех обследованных больных с эозинофилией крови варьировал от 3,05 до 5,07 усл.ед. при норме 1,81 усл.ед. Обнаруженные нами изменения морфологии эозинофильных гранулоцитов носили преимущественно признаки дегрануляции и цитолиза: разбухшие клетки в два и более раз превышали размеры нейтрофилов, их оболочка была разорвана, рядом располагались гранулы. Кроме того, была зарегистрирована повышенная вакуолизация ядра и цитоплазмы эозинофилов.

Согласно современным представлениям, противоопухолевая активность эозинофильных гранулоцитов и эффективный лизис последними инфектогенов паразитарной природы опосредованы их способностью к фагоцитозу и цитотоксическому действию [Джальчинова В.Б., Чистяков Г. М., 1999; Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999; Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 2000; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Волкова М.А., 2001; Яковлева В.В. и соавт., 2003]. В ходе проведенного цитохимического исследования у пациентов с гемобластозами и инвазией *O.felineus*, сопровождающимися развитием эозинофильной реакции крови, было отмечено повышение (по сравнению с нормой) числа активных эозинофилов в отношении обнаружения гранул лизосомальных катионных белков и эозинофильной пероксидазы. Выявленные изменения изученных параметров носили однонаправленный характер не зависимо от особенностей нозологии (у пациентов с лимфогранулематозом значения средних цитохимических коэффициентов содержания внутриклеточных катионных белков и пероксидазы оказались равными $2,93\pm 0,02$ ($p=0,011$) и $2,95\pm 0,03$ усл.ед. ($p=0,043$); множественной миеломой - $2,95\pm 0,06$ усл.ед. ($p=0,003$) и $2,79\pm 0,07$ усл.ед. ($p=0,039$); неходжкинскими лимфомами - $2,42\pm 0,08$ ($p=0,041$) и $2,69\pm 0,07$ усл.ед. ($p=0,048$); острым описторхозом $2,95\pm 0,06$ ($p=0,022$) и $2,99\pm 0,03$ усл.ед. ($p=0,045$) и при хроническом течении данного гельминтоза - $2,78\pm 0,05$ ($p=0,015$) и $2,89\pm 0,02$ усл.ед. ($p=0,029$) при норме $2,17\pm 0,07$ и $2,53\pm 0,07$ усл.ед. соответственно). В свою очередь, предпринятая оценка биоцидной активности эозинофилов крови у лиц, страдающих гемобластозами и у пациентов с описторхозом, течение которых было ассоциировано с синдромом эозинофилии, в тесте восстановления нитросинего тетразолия, отражающего активацию гексозомонофосфатного шунта, позволило констатировать факт увеличения количества диформаза-позитивных клеток в спонтанном и индуцированном пирогеналом НСТ-тесте по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (у лиц, страдающих лимфогранулематозом, множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами значения спонтанного и индуцированного пирогеналом НСТ-теста превышали аналогичные показатели контроля в среднем в 2,8 ($p=0,012$, $p=0,04$ и $p=0,011$) и в 1,5 раза ($p=0,041$, $p=0,034$ и $p=0,039$); у пациентов с острым и хроническим течением описторхоза в - 2,1 ($p=0,012$ и $p=0,04$) и в 2,5 раза ($p=0,041$ и $p=0,034$), соответственно).

Очевидно, что значительный рост содержания цитотоксических компонентов гранул в эозинофилах и усиление их фагоцитарной активности может явиться следствием усиления их функциональной активности при вышеуказанных патологиях. Данное обстоятельство может быть опосредовано как антигенной стимуляцией, так и активирующим влиянием хемотаксических факторов, среди которых ключевую роль играют эозинофилспецифичные медиаторы (IL-3, IL-5, eotaxin, RAF и др.) [Беклемишев И.Д., 1998; Воробьев А.И., 2002]. Следует отметить, что концентрация последних в сыворотке крови нередко оказывается увеличенной при целом ряде заболеваний, сопровождающихся эозинофилией [Бережная Н.М., 2000; Воробьев А.И., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005; Флеминг М.В. и соавт., 2005; Munitz I. et al., 2006].

Резюмируя вышеизложенное, следует подчеркнуть, что значительное увеличение размеров эозинофильных клеток, образование ими инвагинаций цитоплазматической мембраны, а также усиление дегрануляции и цитолиза эозинофилов, выявленное нами при вышеуказанных нозологиях, с одной стороны, может являться следствием их гиперактивации, а, с другой, - быть фактором, способствующим усилению цитотоксичности эозинофильных гранулоцитов. В свою очередь, интенсификация кислороднезависимых и кислородзависимых процессов киллинга эозинофилов, обнаруженное нами при заболеваниях, сопровождающихся эозинофилией, 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.

Говоря о роли явления эозинофилии в прогнозировании исхода заболеваний разного генеза и развития их осложнений, на наш взгляд правильно рассмотреть эозинофил с точки зрения участия этой клетки в регуляции иммунологического и тканевого гомеостаза (рис. 4). Как упоминалось ранее, известные на сегодняшний день механизмы формирования эозинофилий периферической крови: антителозависимый хемотаксис, развивающийся при паразитозах (IgE- или IgG-антитела); иммунный, опосредованный через IgE (характерен для аллергии); ответ на эозинофильный хемотаксический фактор, выделяемый некоторыми опухолями; собственно опухолевая эозинофилия – лейкоз, не позволяют сформировать целостного представления о патогенезе данного феномена при патологических процессах разного генеза, касаясь лишь клинической стороны вопроса [Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Минеев В.Н. и соавт., 2000; Воробьев А.И., 2003; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Дискутабельными остаются вопросы о целесообразности, а также о закономерностях и особенностях формирования эозинофильной реакции при различных патологических процессах.

Молекулярно-биологические подходы, используемые в последние годы в медицине, позволили значительно расширить возможности изучения патогенеза многих заболеваний и синдромов [Хаитов Р.М. и соавт. 2000;

Фрейдлин И.С., 2001; Воробьев А.И., 2002, 2003]. Изучение аспектов дисрегуляции межклеточных взаимодействий эффекторных клеток, к которым с полным основанием можно отнести клетки крови, является, безусловно, преобладающим в установлении пусковых механизмов развития любого патологического процесса [Иванов А.А. и соавт., 2005]. Принимая во внимание вышесказанное, логично предположить, что феномен эозинофилии, сопутствующий течению многих заболеваний, имеющих разнообразные механизмы возникновения, есть не что иное, как результат дискоординированного функционирования клеточных элементов, в частности, эозинофилов и иммуноцитов, входящих в состав кооперации.

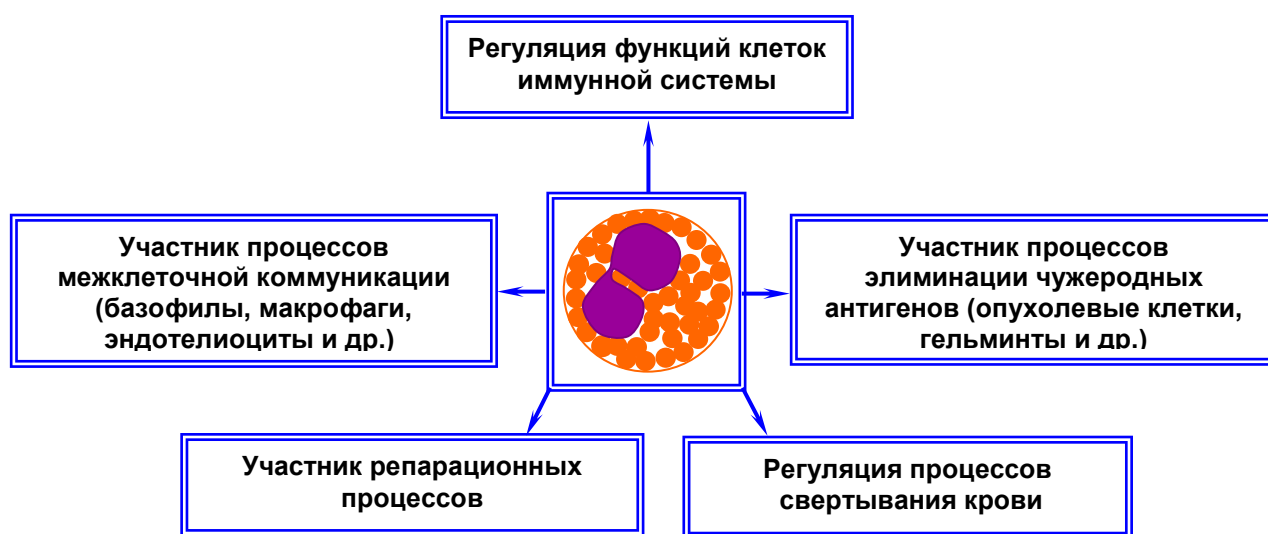


Рис. 4. Роль эозинофила в регуляции гомеостаза [по данным А.И. Воробьева, 2002; J.G. Zangrilli, 2002; Н.М. Бережной и соавт., 2005]

Исследования особенностей реагирования системы иммунитета на различные антигенные структуры как в норме, так и при типовых патологических процессах свидетельствуют о том, что существующий в организме баланс показателей клеточного звена иммунитета является одним из важнейших условий поддержания эффективного иммунного ответа на внедрение многообразных патогенов, где ключевая роль принадлежит иммунокомпетентным клеткам периферической крови, в частности лимфоцитам [Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2004; Ярилин А.А., 2004]. Проведенный нами анализ показателей, характеризующих субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови и описторхозной инвазией, сопровождающихся длительной эозинофилией крови, и у больных без эозинофилии, позволил констатировать факт изменения параметров, характеризующих способность лимфоцитарных клеток экспрессировать маркеры клеточной дифференцировки. Так, у лиц с гемобластозами и гельминтозом, обусловленном паразитированием *O.felineus*, вне зависимости от нозологии и наличия эозинофилии периферической крови отмечалось значительное уменьшение содержания $CD3^{+}$ -, $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -клеток, а также

снижение индекса иммунореактивности ($CD4^+/CD8^+$) по сравнению с соответствующими величинами у лиц контрольной группы. В то же время у всех пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови выявлялось достоверное снижение (по сравнению с нормой) абсолютного количества клеток, экспрессирующих фенотипические маркеры В-лимфоцитов ($CD22^+$), тогда как у больных описторхозом вне зависимости от фазы течения клинического процесса и наличия эозинофилии крови отмечалась значительная активация гуморального звена иммунитета.

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; 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].

В то же время иммунный ответ при паразитозах имеет специфические особенности, связанные с эволюционно сформировавшимися биологическими механизмами длительного сосуществования макроорганизма и паразитарного инфекта на условиях взаимоадаптации [Озерецковская Н.Н., 2000; Falcone F. et al., 2004]. В современной литературе наиболее согласуются данные о значительной уязвимости при инвазии *O.felineus* Т-системы лимфоцитов, что проявляется изменением количественных характеристик этой популяции клеток и ее отдельных субпопуляций [Озерецковская Н.Н., 2000; Кальгина Г.А. и соавт., 2002; Яковлева В.В. и соавт., 2003]. В то же время активация гуморального звена иммунного ответа при заражении *O.felineus*, по мнению К.Р. Fedorov et al. [2002] и А. Pauly et al. [2003], отражает особенности взаимодействия макроорганизма с антигенами *O.felineus*, характеризующимися слабовыраженной иммуногенностью, что позволяет предположить компенсаторный характер индукции В-клеточной компоненты иммунной защиты при данном гельминтозе.

Резюмируя вышесказанное, следует подчеркнуть, что детальное исследование субпопуляционного состава циркулирующих Т-лимфоцитов у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у лиц с описторхозом с убедительностью доказало факт нарушения количественных характеристик клеточного и гуморального звеньев иммунной системы, что, видимо, определяется особенностями течения основного заболевания.

Значительную роль в установлении и стабилизации контактов между взаимодействующими клетками макроорганизма играет цитокин-рецепторная

сеть [Фрейдлин И.С., 1996; Беклемишев И.Д., 1998; Кашкин К.Е., 1998; Ярилин А.А., 1999, 2001; Ковальчук А.В. и соавт., 2001; Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2002, 2004]. Именно посредством цитокиновых молекул осуществляются лиганд-рецепторные взаимодействия, обеспечивая трансдукцию сигнала внутрь клетки и индуцируя изменения её внутриклеточного метаболизма [Кашкин К.Е., 1998; Ярилин А.А., 1999, 2001; Romagnani S., 1999; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Кетлинский С.А., 2002; Симбирцев А.С., 2004; Pritchard D.I. et al., 2004].

Согласно современным представлениям, дисбаланс в системе цитокинов, регулирующих клеточные и гуморальные реакции иммунитета, определяет развитие многих заболеваний [Медуницын Н.В., 1993; Озерецковская Н.Н., 1997; Magnan A. et al., 1997; Беклемишев И.Д., 1998; Ешану В.С., 2004]. По данным ряда авторов, поляризация иммунного ответа преимущественно в сторону Th-2 пути может обуславливать формирование эозинофилии при патологических процессах разного генеза [Newcom S.R. et al., 1992; Медуницын Н.В., 1993; Бережная Н.М., 2000; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Данное положение связано с тем, что на сегодняшний день четко определен спектр ключевых цитокинов (IL-3, IL-5, IL-4, IL-8, GM-CSF, MCP, эотаксин, RAF и др.), продуцируемых преимущественно Th-2-лимфоцитами и принимающих участие в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки, апоптоза, дегрануляции, осуществлении механизмов цитотоксичности и хемотаксиса лейкоцитов эозинофильного ряда [Rojas R.E., Martinez J.E., 1999; Бережная Н.М., 2000; Минеев В.Н. и соавт., 2000; Намазова Л.С. и соавт., 2000; Nagase H. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002; Zangrilli D., 2002; Бережная Н.М. и соавт., 2005] (рис. 5).

В связи с этим в поле зрения нашего исследования оказались механизмы нарушения цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и мононуклеарных клеток при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозной инвазии, сопровождающихся формированием эозинофильной реакции крови.

Как показало проведенное нами с помощью иммуноферментного анализа исследование способности мононуклеарных лейкоцитов периферической крови продуцировать эозинофилспецифичные цитокины, у лиц с лимфопролиферативными гематологическими заболеваниями и у больных с описторхозом, ассоциированных с явлением эозинофилии, отмечалось значимое увеличение уровней базальной и ФГА-индуцибельной секреции IL-5 и GM-CSF, а также конституциональной продукции IL-3 по сравнению с аналогичными значениями у здоровых индивидов и у пациентов без эозинофилии, включенных в группы сравнения (с гемобластозами и хроническим описторхозом) (рис. 6). У лиц с хроническим описторхозом (реинвазия, суперинвазия), сопряженным с развитием эозинофильной реакции крови, способность мононуклеаров крови секретировать IL-3 не отличалась от таковой в норме (рис. 6).

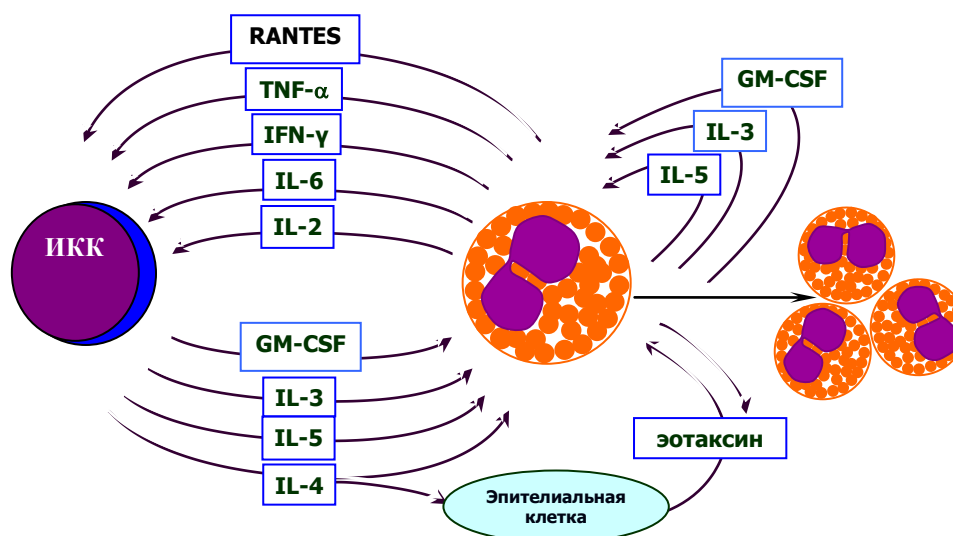


Рис. 5. Цитокиноопосредованная кооперация иммунокомпетентных клеток (ИКК) и эозинофильных гранулоцитов [по данным И.Д. Беклемишева, 1998; А.И. Воробьева, 2002; Н.М. Бережной и соавт., 2005]

При исследовании содержания IL-4 в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов у больных со злокачественными заболеваниями системы крови вне зависимости от нозологии и наличия эозинофилии крови отмечалось выраженное угнетение спонтанной (в среднем на 34%, $p=0,021$, $p=0,017$, $p=0,023$, $p=0,031$) и ФГА-стимулированной продукции (в среднем на 42%, $p=0,028$, $p=0,041$, $p=0,001$, $p=0,001$) данного цитокина, по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (рис. 6в).

У всех обследованных пациентов с описторхозом независимо от наличия эозинофилии крови и стадии клинического процесса, напротив, отмечалось повышение (по сравнению с нормой) уровней конституциональной и ФГА-индуцированной продукции мононуклеарными клетками IL-4 по сравнению с аналогичными параметрами в контроле (рис. 6в).

Анализируя возможные причины повышенной секреции изученных цитокинов мононуклеарами крови на фоне выявленного количественного дефекта Т-звена иммунитета при злокачественных заболеваниях системы крови, следует отметить, что данное обстоятельство может быть обусловлено как прямым, так и опосредованным стимулирующим влиянием опухолевых клеток на субпопуляции CD4⁺-клеток [Трапезников Н.Н. и соавт., 1996; Хорошко Н.Д. и соавт., 1998; Морозова В.Т. и соавт., 2000; Волкова М.А., 2001]. Последние, секретирова медиаторы (IL-4, IL-3, IL-5 и др.), модулирующие процессы клеточного гомеостаза эозинофилов, опосредуют тем самым развитие эозинофильной реакции в крови и в большинстве случаев инфильтрацию эозинофилами опухолевой ткани [Трапезников Н.Н. и соавт., 1996; Лорие Ю.Ю., 2000; Зеленова О.В. и соавт., 2002; Foss H.D., 2000]. Снижение уровня

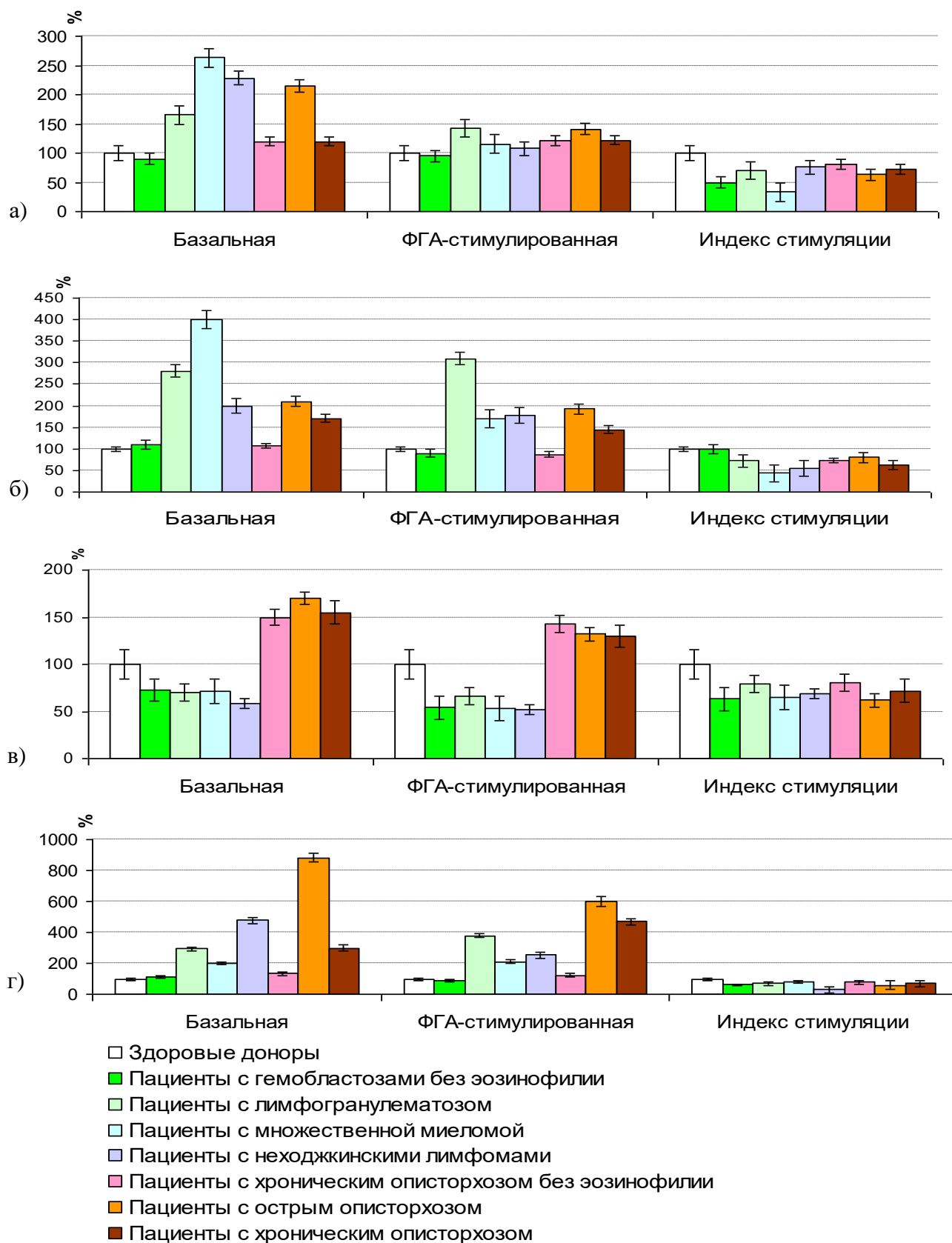


Рис. 6. Продукция IL-5 (а), IL-3 (б), IL-4 (в) и GM-CSF (г) мононуклеарными лейкоцитами периферической крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, сопровождающимся эозинофилией

продукции IL-4 – ключевого медиатора Th-2 иммунного ответа при гемобластозах на наш взгляд следует рассматривать с позиции опухолевого процесса, поскольку известно, что IL-4 является мощным ингибитором роста опухолевых клеток как *in vivo*, так и *in vitro*. В связи с этим дисбаланс продукции рассматриваемого цитокина при неопластических заболеваниях может быть связан с его повышенным потреблением в условиях злокачественной патологии и явиться одним из основных звеньев, способствующих снижению противоопухолевой защиты организма, и, как следствие, - неизбежной прогрессии заболевания [Хаитов Р.М., 2001; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

В свою очередь в литературе имеются сведения, согласно которым при тканевых паразитозах, ассоциированных с высокой эозинофилией крови, пусковыми механизмами стимуляции активности Th2-лимфоцитов являются растворимые метаболиты и компоненты кутикулы/тегумента инвазионных личинок паразитов - инициаторов иммунного ответа хозяина [Кашкин К.Е., 1998; Озерецковская Н.Н., 2000]. Так, обнаруженное нами увеличение секреции IL-4, IL-5 и IL-3 мононуклеарами крови при описторхозе, возможно, обусловлено способностью попадающих в кровотоки эпитопов антигенов гельминтов (*O.felineus*) определенным образом индуцировать продукцию данных медиаторов активированными CD4⁺-лимфоцитами [Беклемишев Н.Д., 1998; Озерецковская Н.Н., 2000; Falcone F.H. et al., 2004; Ольховский И.А., Шакина Н.А., 2005].

Обращало на себя внимание снижение значений индекса стимуляции продукции вышеуказанных цитокинов (IL-3, IL-5 и GM-CSF) у всех обследованных больных с эозинофилией крови (более чем в 2 раза) по сравнению с его уровнем у здоровых доноров, не отличаясь от аналогичных показателей в группе пациентов без эозинофилии. 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] (рис. 6).

Развитие высокой эозинофилии при рассматриваемых нами патологиях, сопряженных с развитием эозинофилии крови, может быть опосредовано и действием эотаксина – хемокина, специфично действующего в отношении лейкоцитов эозинофильного ряда [Griffiths-Johnson D.A. et al., 1993; Resnick M.B., Weller P.F., 1993; Gonzalo J. et al., 1996; Humbles A.A. et al., 1997; Kay A.B. et al., 1997; Тотолян А.А., 2001]. Основными продуцентами данного медиатора являются эпителиальные клетки и сами эозинофильные гранулоциты [Rothenberg M.E et al., 1995; Bartels J. et al., 1996; Li D. et al., 1997; Lilly C.M. et al., 1997; Zangrilli J.G., 2002]. В ходе настоящего исследования было зарегистрировано значительное повышение уровня эотаксина в сыворотке крови у больных с лимфогранулематозом, ассоциированным с эозинофилией крови (до 115,0 (63,82-140,5) пг/мл, $p=0,045$, при норме 58,95 (50,11-66,95) пг/мл) (рис. 7). У лиц с множественной миеломой и 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

$p=0,070$) (рис. 7). В то же время оценка концентрации сывороточного уровня эотаксина у лиц, страдающих острым и хроническим описторхозом, сопряженных с формированием эозинофилии крови, так и без таковой показала, что данный параметр превосходил (в среднем на 26%) соответствующие значения контроля ($p=0,021$, $p=0,003$ и $p=0,045$) у всех обследованных пациентов с описторхозной инвазией (рис. 7).

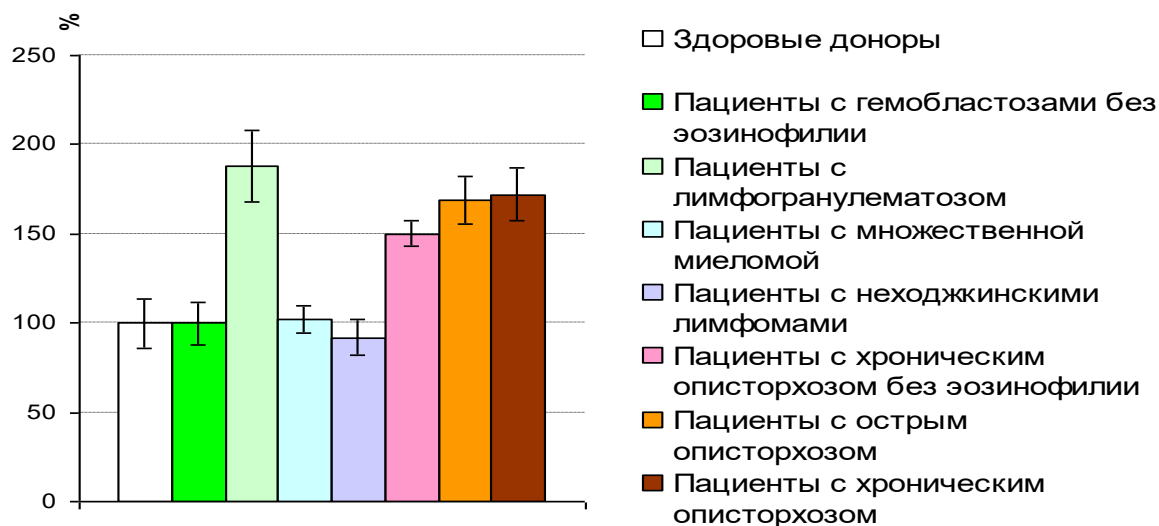


Рис. 7. Концентрация эотаксина в сыворотке крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, сопровождающимися эозинофилией

Таким образом, в результате проведенного нами исследования у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови и у больных описторхозом, сопровождавшимися формированием эозинофильной реакции крови, выявлен существенный дисбаланс секреции ключевых медиаторов, принимающих участие в регуляции механизмов клеточного гомеостаза эозинофильных гранулоцитов. Это создает условия для усиления напряженности как процессов дифференцировки гемических эозинофилов в тканевые элементы, обеспечивая их повышенную миграцию в очаг воспаления, так и обратной рециркуляции эозинофильных клеток в кровяное русло. Для изучения взаимосвязей между способностью мононуклеарных клеток продуцировать цитокины (IL-3, IL-5, IL-4, GM-CSF) и концентрацией эотаксина в сыворотке крови с выраженностью эозинофильной реакции крови, а также с целью определения роли отдельных медиаторов в формирование эозинофилии крови при вышеуказанных нозологиях, нами был проведен корреляционный и, в последующем пошаговый регрессионный анализы. В ходе установления зависимости между исследуемыми параметрами было показано, что развитие эозинофильной реакции, осложняющей течение рассматриваемых нами нозологий, было обусловлено повышенной продукцией мононуклеарами медиаторов IL-5 и IL-3, что подтверждается наличием положительных корреляционных связей между изученными показателями у больных лимфогранулематозом, множественной

миеломой и острым описторхозом ($r=0,620$, $p<0,05$ 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). Небезынтересно, что у лиц, страдающих лимфомой Ходжкина и у пациентов с острым гельминтозом, обусловленном инвазией *O.felineus*, нами также было обнаружено наличие позитивных связей между концентрацией эотаксина и относительным содержанием эозинофилов в периферической крови ($r=0,502$, $p<0,05$ и $r=0,790$, $p<0,05$), что свидетельствует о значительной роли данного хемокина в механизмах реализации феномена эозинофилии при этих заболеваниях. В свою очередь с помощью регрессионного анализа было показано, что из выявленных значимых параметров (IL-3, IL-5 и эотаксин) наибольший вклад в формирование эозинофильной реакции крови при лимфогранулематозе и остром описторхозе вносит IL-5 (соответственно, $\beta=1,07$, $p=0,15$ и $\beta=1,15$, $p=0,18$).

В настоящее время становится очевидным, что изучение механизмов межклеточной кооперации заключается, с одной стороны, в оценке продукции медиаторов, опосредующих кооперативное взаимодействие клеток, а, с другой, - обязательным этапом подобных исследований является анализ клеточных рецепторных структур.

Общеизвестно, что эозинофилы на своей мембране несут разнообразные антигенные структуры [Carpon M. et al., 1984; Wardlaw A.J., 1993; Valent P., 1994; Seminário M.C., Vochner B.S., 1997; Matsumoto K. et al., 1998; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Tachimoto H., Vochner B.S., 2000; Воробьев А.И., 2002] (рис. 8). Ключевую роль в реализации механизмов межклеточной кооперации эозинофильных гранулоцитов и иммунокомпетентных клеток играют рецепторы к цитокинам. Показано, что эозинофилы презентруют рецепторы (R) к IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, эотаксину (CCR3), GM-CSF и др. [Mawhorter S.D. et al., 1996; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Воробьев А.И., 2001; Минеев В.Н. и соавт., 2001; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Стимуляция эозинофильных лейкоцитов антигенными детерминантами приводит к синтезу определенного набора медиаторных молекул, экспрессии соответствующих цитокиновых рецепторов и активации опосредуемых ими функций [Newcom S.R. et al., 1992; Serrano D. et al., 1997; Беклемишев И.Д., 1998; Vochner B.S., 2000; Nagase H. et al., 2001; Steinke J.W. 2002].

Проведенное нами исследование методом лазерной проточной цитофлуориметрии презентации рецепторов к IL-5, IL-3 и CCR3 в интактной культуре эозинофилов *in vitro*, полученных у больных гемобластозами (лимфогранулематоз, множественная миелома и неходжкинские лимфомы) и описторхозом (острый и хронический), ассоциированных с эозинофилией, позволило констатировать достоверное увеличение абсолютного и относительного количества IL-5R-, IL-3R- и CCR3-позитивных клеток у всех обследованных пациентов по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (рис. 9, 10). При хроническом гельминтозе, обусловленном *O.felineus* (реинвазия, суперинвазия), и при неходжкинских лимфомах число

эозинофилов, экспрессирующих CCR3, варьировало в пределах нормальных значений ($p=0,637$ и $p=0,057$) (рис. 10).

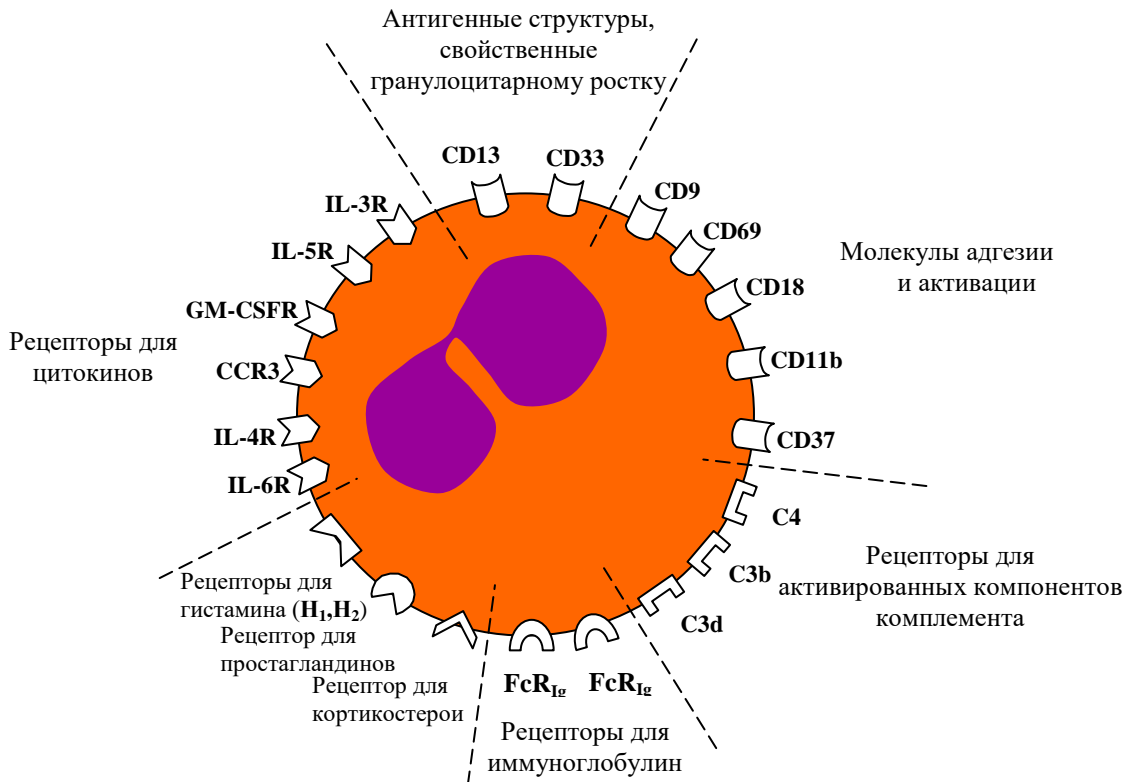


Рис. 8. Рецепторный аппарат эозинофильных гранулоцитов [по данным А.И.Воробьева, 2002; Н.М. Бережной и соавт., 2005]

Установленное в результате настоящего исследования увеличение фракции эозинофильных клеток, презентующих IL-5R, IL-3R и CCR3, у пациентов с гемобластозами и описторхозной инвазией, сопровождавшимися эозинофилией, может быть опосредовано влиянием одноименных медиаторов, секретируемых в избыточных концентрациях мононуклеарными лейкоцитами периферической крови. Этот тезис подтверждается положительной корреляционной зависимостью между уровнями базальной продукции мононуклеарами крови IL-3, IL-5 и эотаксина в сыворотке крови с количеством IL-3R-, IL-5R- и CCR3-позитивных клеток у больных лимфогранулематозом и острым описторхозом, что свидетельствует о тесной взаимосвязи изученных показателей (соответственно $r=0,560$, $p<0,05$; $r=0,511$, $p<0,05$ и $r=0,651$, $p<0,05$ – для пациентов с лимфогранулематозом и $r=0,64$, $p<0,05$; $r=0,43$, $p<0,05$ и $r=0,541$, $p<0,05$ – у больных с острым гельминтозом, обусловленном инвазией *O.felineus*).

Как упоминалось ранее, способность презентировать мембранноассоциированные цитокиновые рецепторы клеткой усиливается после её активации одноименными медиаторными молекулами или антигенными детерминантами, что может отражать состояние функционального потенциала клетки в отношении экспрессии тех или иных

рецепторных структур [Ройт А., 2000; Фрейдлин И.С., 2001; Симбирцев А.С., 2002, 2004]. В связи с этим для уточнения представлений о резервных возможностях эозинофильных гранулоцитов в отношении презентации цитокиновых рецепторов в процессе нашего исследования мы проводили инкубацию эозинофильных клеток с рекомбинантными формами эозинофилспецифичных цитокинов (r-IL-3, r-IL-5, r-eotaxin) *in vitro*.

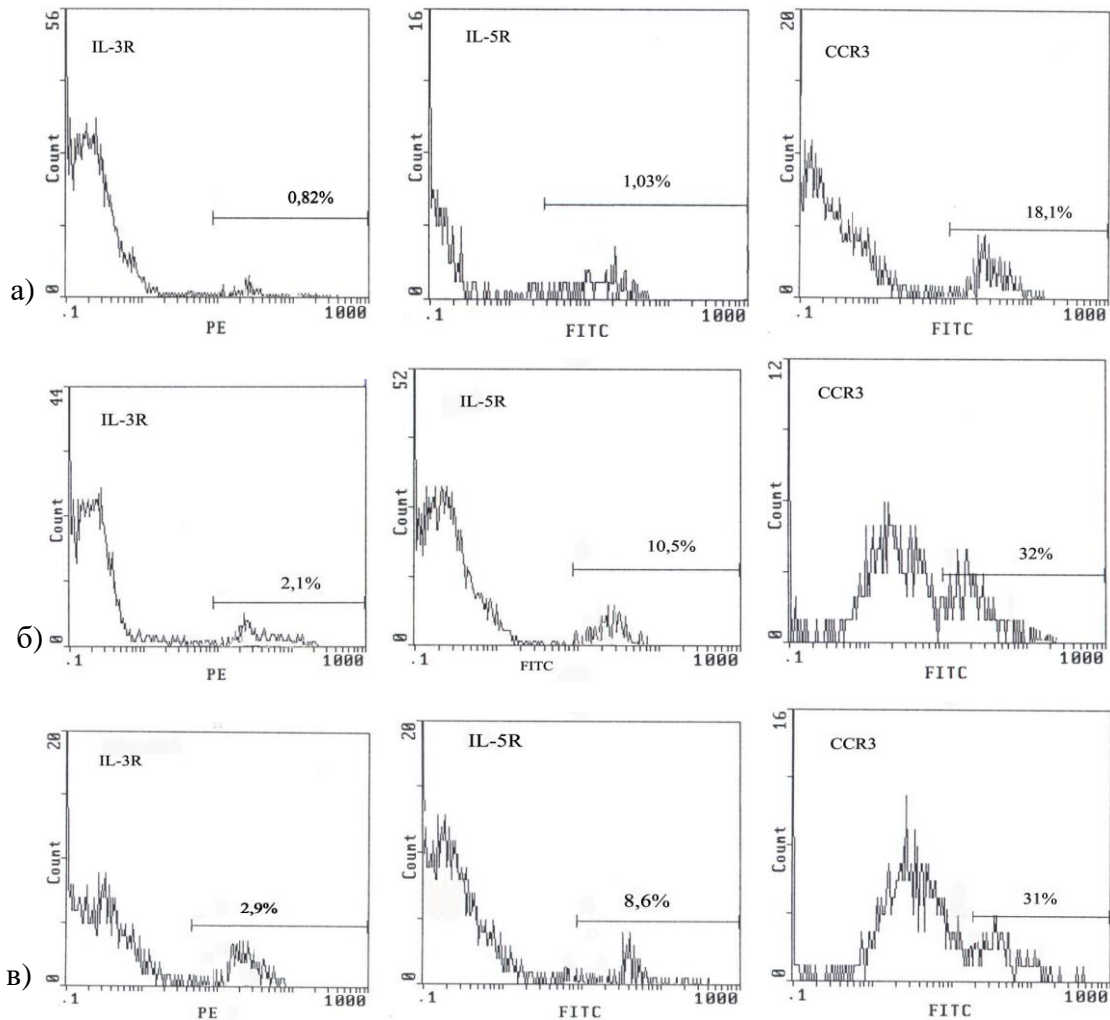


Рис. 9. Гистограммы, отражающие количество эозинофилов (%) периферической крови у здорового донора (а), у больного лимфогранулематозом (б), у пациента с острым описторхозом (в), несущих рецепторы к цитокинам (IL-3, IL-5, эотаксину) в интактных культурах (по данным проточно-цитометрического анализа)

При добавлении в культуру эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, ассоциированными с эозинофилией, r-IL-5, r-IL-3 и r-eotaxin у всех обследованных лиц вне зависимости от особенностей течения основного заболевания мы обнаружили с высокой степенью достоверности (по сравнению с нормой) повышение относительного и абсолютного содержания IL-5R- и CCR3-несущих эозинофилов и абсолютного числа клеток эозинофильного ряда, экспрессирующих IL-3R (рис. 10). При этом относительное число эозинофилов,

презентирующих CCR3, при хроническом описторхозе и неходжскинских лимфомах, хотя и было несколько повышенным, но достоверной разницы средних значений данного показателя у этих больных и здоровых лиц зафиксировано не было ($p=0,089$ и $p=0,245$) (рис. 10).

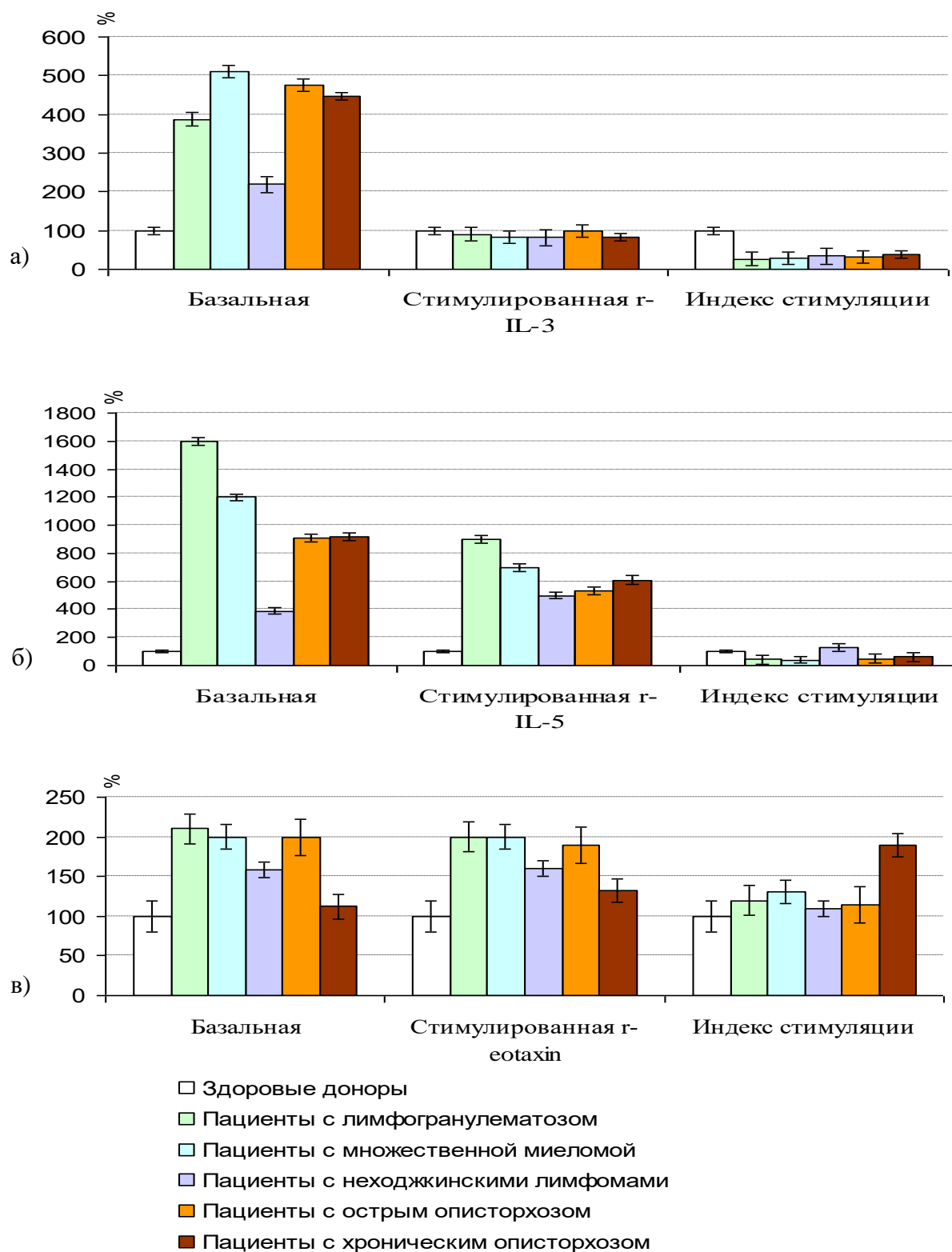


Рис. 10. Содержание IL-5R- (а), IL-3R- (б) и CCR3-позитивных клеток (в) в культуре эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и больных гельминтозом, вызванном *O. felineus*, сопровождающихся эозинофилией

Рассчитанные нами индексы стимуляции презентации IL-5R и IL-3R у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, ассоциированными с эозинофилией, оказались достоверно ниже (в среднем - в 1,8 раз) аналогичных показателей в норме (рис. 10). Данное обстоятельство может свидетельствовать о снижении резервной способности эозинофильных гранулоцитов экспрессировать рецепторы к IL-5 и IL-3.

По-видимому, при изученных нами нозологиях, осложненных развитием эозинофилии крови, клетки эозинофильного ряда с изначально высокой способностью презентировать рецепторы к эозинофилспецифичным цитокинам в условиях дополнительной стимуляции не способны адекватно воспринимать активационные цитокиновые сигналы, что может быть также обусловлено функциональной резистентностью к действию вышеуказанных цитокинов. Индекс стимуляции экспрессии CCR3 у всех пациентов с эозинофилией крови не зависимо от нозологии соответствовал контрольным значениям (рис. 10). Лишь у лиц, страдающих хроническим описторхозом (реинвазия, суперинвазия), данный показатель в 2 раза превышал аналогичные параметры у здоровых доноров ($p=0,021$) (рис. 10).

Нарушение баланса рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов может являться еще одним механизмом, лежащим в основе длительного пребывания эозинофильных гранулоцитов в периферической крови при гемобластозах и описторхозе. У пациентов с лимфогранулематозом и острым описторхозом это предположение подтвердилось фактом наличия позитивной корреляции между относительным количеством клеток, презентующих рецепторы к IL-5 и эотаксину, и процентным содержанием эозинофильных гранулоцитов в крови (соответственно $r=0,863$ и $r=0,641$, $p<0,05$ – при злокачественной лимфоме; $r=0,780$ и $r=0,921$, $p<0,05$ – при остром описторхозе).

Проблема формирования гемической и тканевой эозинофилий при патологических процессах разного генеза на сегодняшний день рассматривается сквозь призму особенностей программированной клеточной гибели [Druilhe A., 1996; Dewson et al., 1998; Saita N. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002; Munitz A. et al., 2006].

При изучении показателей, характеризующих степень выраженности апоптоза эозинофилов, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и больных с острым гельминтозом, вызванном *O.felineus* с помощью метода проточной лазерной цитометрии с использованием FITC-меченного аннексина V [Van England A. et al., 1998; Eeden S.F. et al., 1999], нами было зарегистрировано значительное обеднение фракции эозинофильных гранулоцитов, подвергшихся спонтанному апоптозу, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых лиц (до $4,61\pm 0,86\%$ ($p=0,015$) – у больных лимфогранулематозом; $3,35\pm 0,07\%$ ($p=0,034$) – у лиц с множественной миеломой; $4,34\pm 0,67\%$ ($p=0,020$) – у пациентов с неходжкинскими лимфомами; $7,21\pm 0,92\%$ ($p=0,025$) – у лиц с острым описторхозом при норме $14,94\pm 1,09\%$) (рис. 11). При хроническом течении описторхоза (реинвазия, суперинвазия), ассоциированного с развитием

эозинофильной реакции крови, содержание аннексин-положительных клеток в интактной культуре снижалось относительно нормальных значений, не достигая, однако, статистически значимого уровня ($p=0,054$).

В современной литературе ингибирование программированной гибели эозинофилов цитокинами рассматривается как важный механизм, опосредующий развитие эозинофилии крови при различных заболеваниях [Минеев В.Н. и соавт., 2000; David J. H. et al., 2001; Иванчук И.И. и соавт., 2003, 2004; Бережная Н.М., 2005; Munitz A. et al., 2006]. При проведении корреляционного анализа между уровнем спонтанной гибели эозинофилов и продукцией мононуклеарными клетками крови эозинофилспецифичных цитокинов (IL-5, IL-3 и эотаксина) у обследованных больных с эозинофилией нами были выявлены отрицательные функциональные связи между изученными показателями, в частности, при лимфогранулематозе и остром описторхозе, свидетельствующие о причастности к угнетению апоптотической гибели эозинофилов IL-5, IL-3 и эотаксина (соответственно $-r=0,701$, $p<0,05$; $-r=0,324$, $p<0,05$ и $-r=0,438$, $p<0,05$ – при лимфогранулематозе; $-r=0,562$, $p<0,05$; $-r=0,521$, $p<0,05$ и $-r=0,456$, $p<0,05$ – при остром описторхозе) при данных патологиях.

В ходе реализации настоящей работы для определения роли отдельных цитокинов (IL-3, IL-5 и эотаксин) в модуляции апоптоза эозинофильных клеток при заболеваниях, ассоциированных с эозинофилией крови (лимфопролиферативные заболевания системы крови и гельминтоз, вызванный *O.felineus*), нами был проведен экспериментальный блок исследования *in vitro*.

Установлено, что сигналами к реализации или ингибции апоптоза могут быть изменения концентрации ряда регулирующих этот процесс цитокинов как в норме, так и при патологических процессах [Bruggen T. et al., 1995; Kinoshita T. et al., 1995; Казначеев К.С., 1999]. Согласно данным современной литературы, в отношении лейкоцитов эозинофильного ряда такой способностью обладают IL-5, IL-3, эотаксин и др., увеличивая их выживаемость *in vitro*, блокируя реализацию танатогенной программы [Pazdrak K et al., 1998; Akdis M. et al., 2001; Zangrilli J.G., 2002; Иванчук И.И. и соавт., 2003, 2004; Бережная Н.М., 2005]. В частности, исследование, проведенное с использованием метода проточной цитометрии, в условиях инкубации *in vitro* эозинофилов, полученных у здоровых доноров, в присутствии рекомбинантных форм цитокинов - r-IL-5 и r-eotaxin, позволило выявить выраженное снижение (в среднем на 50% и 43%) уровня апоптотической гибели эозинофильных клеток по сравнению с аналогичными показателями в интактной культуре ($p<0,05$ во всех случаях) (рис. 11). При добавлении *in vitro* r-IL-3 содержание вступивших в апоптоз эозинофилов, полученных у здоровых лиц, не изменялось по сравнению с его интактным уровнем ($p>0,05$). Это, по-видимому, может быть опосредовано меньшей чувствительностью зрелых эозинофильных клеток к антиапоптотному воздействию IL-3, поскольку известно, что экспрессия рецепторов к изучаемому цитокину (IL-3) снижается по мере созревания клеток эозинофильного ряда [Минеев В.Н. и соавт., 2000; Nagase H. et al., 2001; Воробьев А.И., 2002] (рис. 11).

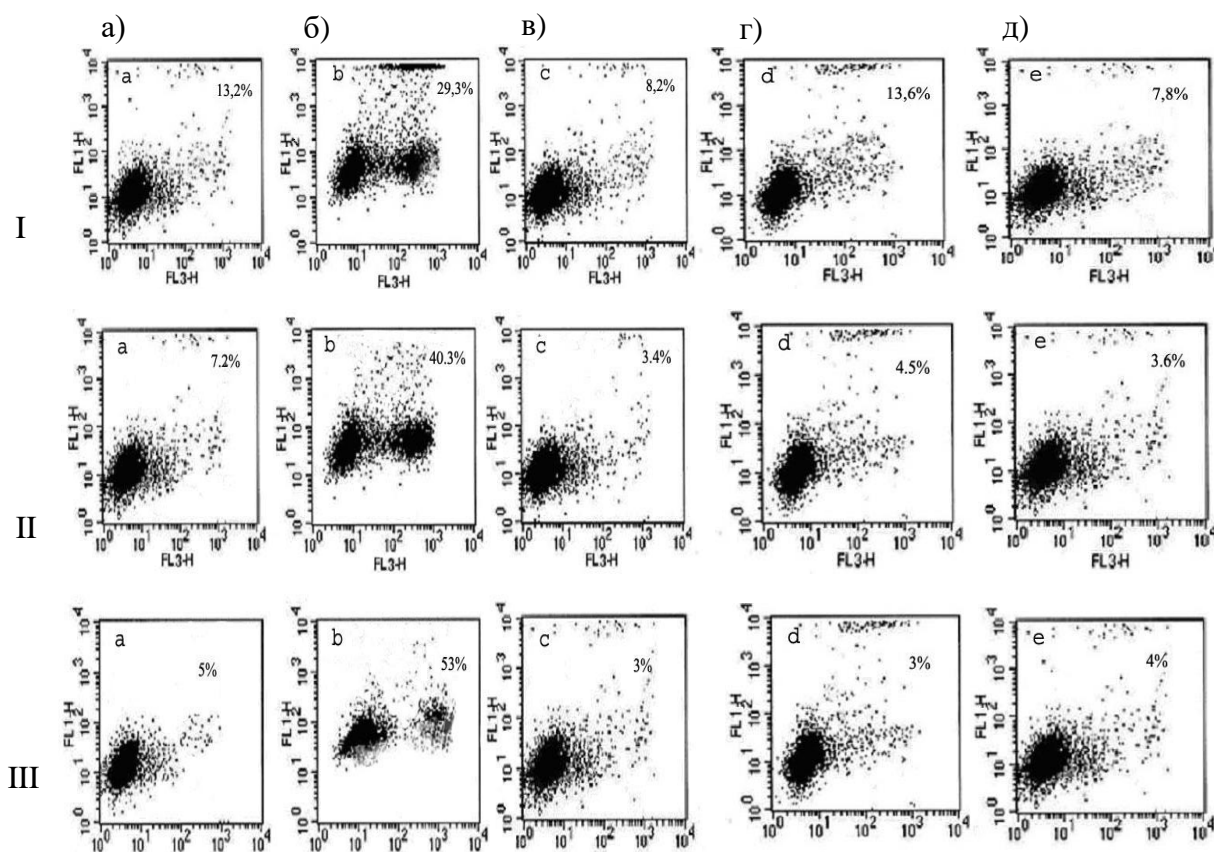


Рис. 11. Гистограммы проточно-цитометрического анализа, отражающие количество апоптотических эозинофилов периферической крови, полученных у здорового донора (I), пациента с острым описторхозом (II), больного лимфогранулематозом (III), культивированных в полной питательной среде (а), при лишении ростовых факторов (бессывороточная среда) (б); при добавлении $r\text{-IL-5}$ (в); при добавлении $r\text{-IL-3}$ (г); при добавлении $r\text{-eotaxin}$ (д)

В свою очередь инкубирование эозинофилов крови, полученных у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, ассоциированных с высокой эозинофилией, с $r\text{-IL-5}$ и $r\text{-eotaxin}$, продемонстрировало отсутствие статистически значимой разницы с выраженностью спонтанного апоптоза изученных клеток ($p > 0,05$ во всех случаях) (рис. 11). Инкубация эозинофильных гранулоцитов, выделенных у лиц с множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами, в полной культуральной среде с добавлением $r\text{-IL-3}$ приводила к значительному обогащению эозинофильной популяции (в среднем на 50%) апоптотическими клетками по сравнению с интактным уровнем их гибели ($p < 0,05$ во всех случаях). У больных лимфогранулематозом данный показатель не отличался от значений спонтанного апоптоза ($p > 0,05$) (рис. 11).

Интерпретация факта отсутствия чувствительности эозинофильных клеток к антиапоптотическому действию IL-5 , IL-3 и эотаксина при гемобластозах, ассоциированных с эозинофилией крови, представляется весьма затруднительной. Выявленные изменения, по-видимому, можно объяснить функциональной неполноценностью эозинофильных клеток, обусловленной как

укорочением клеточного цикла на ранних этапах их созревания, так и увеличением митотического индекса [Bruggen T. et al., 1995; Воробьев А.И., 2002; Zangrilli J.G., 2002], и, как следствие, - появлением в кровотоке генерации юных лейкоцитов эозинофильного ряда с неадекватной реакцией на антиапоптотические стимулы и, соответственно, нарушением реализации их запрограммированной гибели при рассматриваемых патологических процессах. Кроме того, вероятный механизм данного явления может быть опосредован изменением рецепции передаваемого сигнала на мембране эозинофилов при злокачественной патологии системы крови. Однако это умозаключение носит сугубо гипотетический характер, не подкреплено фактическими данными и требует дополнительного специального исследования.

Исследование апоптогенной реакции лейкоцитов эозинофильного ряда, выделенных из периферической крови у лиц, страдающих острым и хроническим описторхозом, в условиях их инкубации *in vitro* с γ -IL-5, IL-5 и γ -eotaxin, напротив, позволило выявить статистически значимое снижение количества клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин на своей поверхности, по сравнению с соответствующими значениями спонтанного апоптоза ($p < 0,05$ во всех случаях) (рис. 11). Возможно, что одним из механизмов выявленного нами изменения запрограммированной гибели эозинофилов на действие антиапоптотических медиаторов при гельминтозе, инициированном *O.felineus*, может быть усиление способности эозинофилов презентировать рецепторные структуры к изученным цитокинам на своей мембране. Это предположение было подкреплено установленным фактом негативной корреляции между относительным содержанием эозинофилов, несущих рецепторы к IL-5, и уровнем их спонтанной гибели при остром описторхозе ($-r = 0,510$, $p < 0,05$). В то же время следует отметить, что повышенная чувствительность эозинофильных клеток к действию γ -IL-5, IL-3 и эотаксину при описторхозе, может свидетельствовать о существенном напряжении процессов эозинофилопоэза в костном мозге и усилении функциональной активности эозинофилов в условиях антигенной стимуляции, требующей значительной поддержки со стороны ростовых факторов выживания при данном гельминтозе [Степанова Т.Ф., 2006].

Общеизвестно, что процессы пролиферации, дифференцировки и элиминации клеток макроорганизма находятся в состоянии равновесия за счет баланса про- и антиапоптотических факторов [Бахов Н.И. и соавт., 1997; Ярилин А.А., 1997; Белушкина Н.Н. и соавт., 1998; Ярилин А.А. и соавт., 2000; Барышников А.Ю., Шишкин А.В., 2002; Потапнев М.П., 2002]. Дефицит факторов роста воспринимается клеткой как сигнал к апоптозу: происходят дефосфорилирование Bad, его внедрение в наружную мембрану митохондрий, выход цитохрома *c* и последующая активация каспазы-9 [Kluck R.M. et al, 1997; Ярилин А.А., 1998]. Согласно полученным нами данным, культивирование эозинофильных клеток *in vitro* в бессывороточной питательной среде, лишенной ростовых факторов, индуцировало гибель более 25% эозинофилов у здоровых доноров и от 42 до 53% - у пациентов с гемобластозами и описторхозом, ассоциированных с развитием эозинофилии (рис. 11).

Обнаруженное нами увеличение процента эозинофильных клеток, вступивших в апоптоз при лишении их ростовых факторов, может свидетельствовать о повышенной чувствительности эозинофилов к проапоптотическим стимулам, что является косвенным отражением значительного напряжения функциональной активности эозинофилов и, возможно, указывает на факт истощения резервных возможностей этих клеток.

Результаты настоящего исследования с убедительностью продемонстрировали ведущую роль нарушений межклеточной кооперации эозинофилов и иммуннокомпетентных клеток в механизмах формирования феномена эозинофилии крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и гельминтозе, инициированном *O. felineus* (рис. 12). Установлено, что гиперэозинофилия, осложняющая течение рассматриваемых нами нозологий, сопровождается увеличением продукции ключевых цитокинов, регулирующих процессы клеточного гомеостаза эозинофильных гранулоцитов (IL-5, IL-3 и GM-CSF), мононуклеарами крови и уровня эотаксина в периферической крови на фоне количественного дефицита Т-клеточного звена иммунной системы. В то же время показано, что у больных гемобластозами и описторхозом, ассоциированных с эозинофилией, фиксируется повышенное количество эозинофильных клеток, несущих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину, опосредованное повышенным уровнем секреции эозинофистимулирующих медиаторов мононуклеарными клетками. При дополнительном воздействии на эозинофильные клетки, полученных у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, сопровождавшимися 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. Следует отметить, что обнаруженное нами угнетение танатогенной программы эозинофилов периферической крови вносит значительный вклад в механизмы развития феномена эозинофилии при рассматриваемых нозологиях. Результатами проведенного эксперимента *in vitro* была продемонстрирована повышенная чувствительность эозинофильных клеток, полученных у пациентов с описторхозом, к антиапоптотному действию IL-3, IL-5 и эотаксина. На основании этого можно сделать вывод о том, что усиление секреции этих цитокинов мононуклеарами крови (IL-3, IL-5, эотаксин) у лиц с инвазией *O. felineus* также вносит вклад в персистенцию эозинофильной реакции за счет подавления реализации танатогенной программы эозинофилов. При лимфопролиферативных заболеваниях системы крови, несмотря на наличие функциональных отрицательных связей между уровнем секреции указанных медиаторов мононуклеарными клетками и количеством клеток в апоптозе, данные экспериментального блока исследования *in vitro* доказывают, что на фоне низких значений базального апоптоза эозинофильных клеток дополнительное воздействие на них рекомбинантных форм цитокинов не оказывает влияния на их апоптотическую реакцию, что может свидетельствовать о неадекватности восприятия изучаемыми клетками про- и

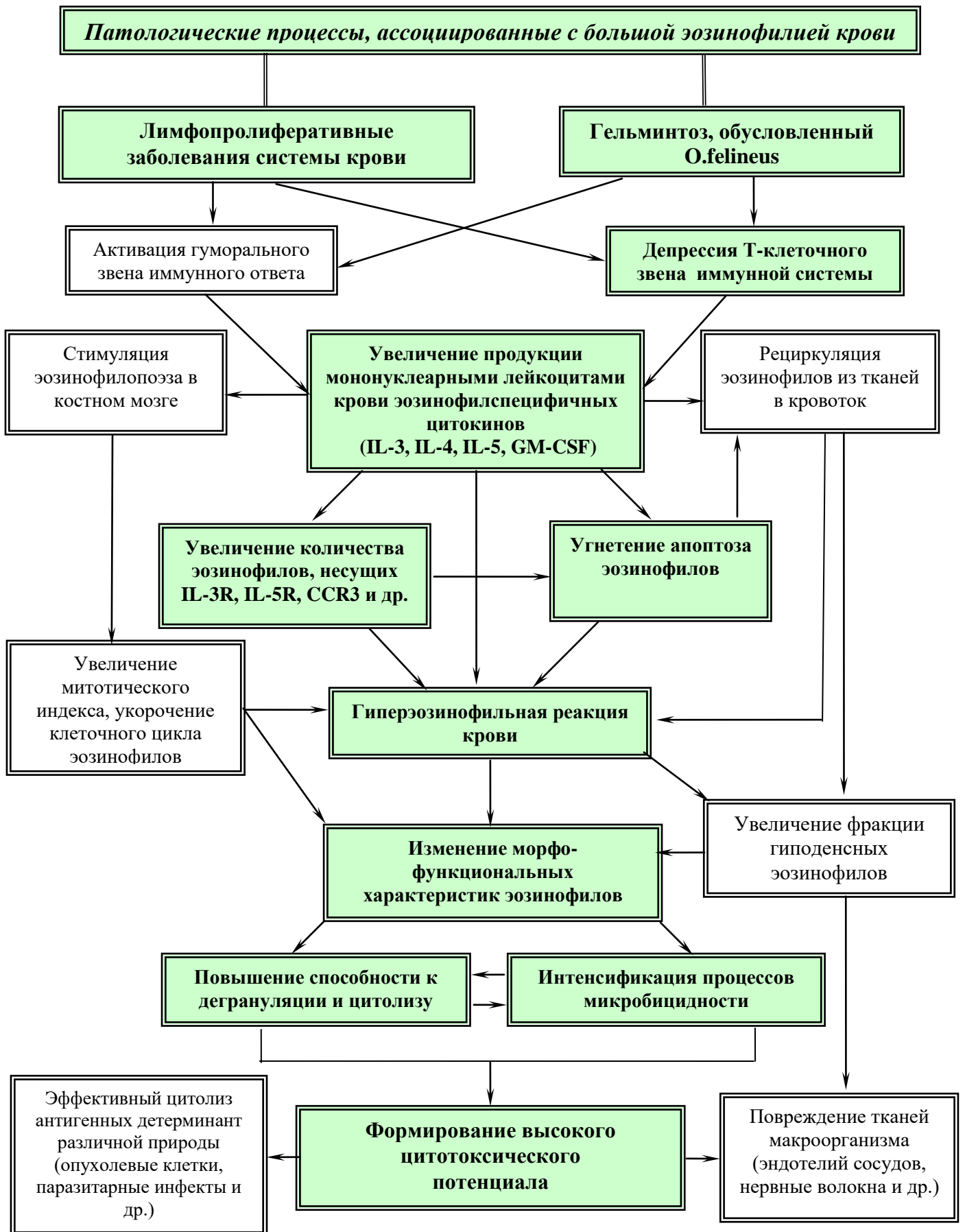


Рис. 12. Роль нарушений кооперации эозинофилов и иммунцитов в патогенезе «больших эозинофилий крови» (по данным И.Д. Беклемишева, 1998; Н. Nagase et al., 2001; А.И. Воробьева, 2002; М. Latrinen et al., 2004; Бережной Н.М. и соавт., 2005 и результатам собственных исследований (выделено))

антиапоптогенных сигналов при злокачественной патологии системы крови. Кроме этого, у всех обследованных пациентов с заболеваниями, ассоциированными с развитием гиперэозинофильной реакции крови (гемобластозы и описторхоз), было выявлено значительное напряжение процессов, обеспечивающих реализацию кислороднезависимых и кислородзависимых механизмов цитотоксичности, и изменение морфофункционального статуса эозинофилов (увеличение размеров клеток, усиление образования ими псевдо- и лобоподий, изменение соотношения компонентов ядерного материала), что в целом ведет к усилению микробицидности эозинофильных гранулоцитов и обуславливает формирование их высокого цитотоксического потенциала (рис. 12).

Таким образом, избыточная продукция цитокинов, являющихся ключевыми в регуляции процессов клеточного гомеостаза эозинофилов, мононуклеарными лейкоцитами, с одной стороны, дисбаланс экспрессии рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов и угнетение их апоптотической гибели, - с другой, на наш взгляд, могут обуславливать нарушение кооперации изученных клеток и являться одними из механизмов, лежащих в основе формирования больших эозинофилий крови при рассматриваемых нами заболеваниях (лимфопролиферативные заболевания системы крови и гельминтоз, вызванный инвазией *O.felineus*) (рис. 12).

Безусловно, в нашем исследовании мы смогли осветить лишь некоторые вопросы, касающиеся механизмов развития гиперэозинофильной реакции крови. Между тем, оценка молекулярных и клеточных механизмов нарушения межклеточной кооперации эозинофилов и иммунцитов при формировании больших эозинофилий крови требует более углубленного и всестороннего изучения.

ВЫВОДЫ

1. При больших эозинофилиях крови лейкоциты эозинофильного ряда претерпевают выраженные изменения морфологических и функциональных свойств.
2. Гиперэозинофилия, осложняющая течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови и описторхоза, сопровождается нарушением баланса морфометрических показателей ядерных и стромальных структур эозинофильных клеток (увеличение площадей ядра и цитоплазмы эозинофилов, рост числа инвагинаций и снижение циркулярности цитоплазмы, изменение соотношения эу- и гетерохроматиновых зон в ядрах эозинофилов), а также их повышенной способностью к дегрануляции и цитолизу по сравнению с нормой.
3. Интенсификация кислороднезависимых и кислородзависимых механизмов микробицидности эозинофилов при гиперэозинофилии крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом приводит к формированию их высокого цитотоксического потенциала.

4. Механизмы развития большой эозинофилии крови при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозной инвазии сопряжены с дисбалансом кооперативного взаимодействия эозинофилов и мононуклеарных лейкоцитов, опосредованного медиаторами, регулируемыми процессы клеточного гомеостаза эозинофильных гранулоцитов.
5. Механизмы нарушения межклеточной кооперации эозинофилов и мононуклеарных клеток при гиперэозинофилии крови у больных лимфопролиферативными гематологическими заболеваниями и описторхозом связаны с повышенным уровнем секреции мононуклеарами ИЛ-3, ИЛ-5 и GM-CSF и увеличением концентрации эотаксина в сыворотке крови при возрастании числа эозинофилов, несущих рецепторы к ИЛ-3, ИЛ-5 и эотаксину, в условиях дефицита Т-клеточного звена иммунной системы.
6. Резервный потенциал эозинофилов в отношении экспрессии ИЛ-3R и ИЛ-5R при лимфопролиферативных заболеваниях системы крови и описторхозе, ассоциированных с формированием гиперэозинофилии, снижен; резервная способность эозинофилов презентировать рецептор к эотаксину не нарушена.
7. Патогенез гиперэозинофилии крови, осложняющей течение лимфопролиферативных заболеваний системы крови и описторхоза, сопряжен с угнетением программированной гибели эозинофилов, опосредованной эозинофилспецифичными медиаторами (ИЛ-3, ИЛ-5, эотаксин).
8. В основе формирования гиперэозинофильной реакции крови у больных гемобластозами и описторхозом лежат однонаправленные, но в разной степени выраженные нарушения кооперативного взаимодействия эозинофилов и иммуноцитов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Литвинова, Л.С. Иммунорегуляторная роль интерлейкина-4 при гемобластозах / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Н.В. Рязанцева // Тезисы докладов Международного конгресса «Иммунитет и болезни: от теории к терапии», Москва, 2005. - С. 170.
2. Изменение продукции ИЛ-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. Особенности цитотоксичности эозинофилов периферической крови при описторхозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Н.В. Рязанцева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, Н.П.Чернышова // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Социально-экологические проблемы природопользования в Центральной Сибири", Красноярск, 2006 года. - С. 359 - 360.
7. 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.
8. Реактивность эозинофилов и лимфоцитов периферической крови при инвазии *Opisthorhis felinus* / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, Н.П. Чернышова, О.Б. Жукова, Н.Ю. Часовских, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2006. - №3. – С. 23 - 27.
9. 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.
10. 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.
11. Изменения иммунологической реактивности при лимфогранулематозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Тезисы докладов XII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 2006. - С. 53 – 54.
12. 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.
13. Механизмы нарушения цитокинопосредованной кооперации эозинофилов и иммуноцитов при формировании феномена эозинофилии / Н.В. Рязанцева,

В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, С.Б. Ткаченко, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Иммунология. – 2007. - №2. - С. 123 – 127.

14. 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.

15. Литвинова, Л.С. Особенности цитокинпродуцирующей способности мононуклеарных клеток периферической крови при гемобластозах, ассоциированных с синдромом эозинофилии / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Н.В. Рязанцева // Тезисы докладов XIII-ой Межгородской научной конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии», Санкт-Петербург, 2007. - С. 76 - 78.

16. Колобовникова, Ю.В. Изменение морфометрических характеристик эозинофилов при гемобластозах, ассоциированных с синдромом эозинофилии / Ю.В. Колобовникова, Л.С. Литвинова // там же. - С.66-68.

17. Особенности цитотоксичности эозинофилов периферической крови при гемобластозах, ассоциированных с синдромом эозинофилии / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий // Тезисы докладов VIII-ой Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильном лечебном учреждении», Санкт-Петербург, 2007. – С. 67.

18. Молекулярные механизмы нарушения кооперации иммуноцитов и эозинофилов при гемобластозах, ассоциированных с синдромом эозинофилии / Л.С. Литвинова Л.С., Ю.В. Колобовникова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий //там же. – С. 93.

19. Новицкий, В.В. Механизмы нарушений кооперации эозинофилов и иммуноцитов при формировании синдрома эозинофилии / В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, Н.В. Рязанцева // Тезисы докладов XI-го Всероссийского научного форума с международным участием «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 2007. – Медицинская иммунология – 2007. – Т.9, №2-3. - С. 281 - 282.

20. Влияние рекомбинантных форм интерлейкинов-5, -3 и эотаксина на апоптоз эозинофильных гранулоцитов / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, Л.С. Литвинова, С.Б. Ткаченко, Ю.В. Колобовникова, О.Б. Жукова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, Е.Н. Кнутарева, Т.Т. Радзивил, Н.Ю. Часовских // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2007. – Т.143, №4. – С. 370 - 374.

21. Изменение продукции ключевых цитокинов регуляции эозинофильных гранулоцитов при инвазии *Opisthorhis felinus* / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, С.Б. Ткаченко, Ю.В. Колобовникова, А.В. Лепехин, Н.П. Чернышова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2007. - №3. – С. 46 - 51.

22. Механизмы нарушения кооперации лимфоцитов и эозинофилов при гемобластозах, сопровождающихся синдромом эозинофилии / Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, В.В. Новицкий, С.Б. Ткаченко, Ю.В. Колобовникова, Е.С.

Григорьева, Е.В. Суворова, Е.Н. Кнутарева, О.Б. Жукова // Медицинская иммунология. – 2007. - №4-5. – С. 326 - 330.

23. Литвинова, Л.С. Клеточные механизмы больших эозинофилий крови / Л.С. Литвинова, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – 145 с.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ИКК – иммунокомпетентная клетка

ИФА – иммуноферментный анализ

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

ППЭ – показатель повреждения эозинофилов

Ig - иммуноглобулин

IL – интерлейкин

Th – Т-хелперы

TNF - фактор некроза опухоли

PAF - фактор активации тромбоцитов

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Рос-здрави д-ру мед. наук, профессору А.В. Лепехину, заведующей отделением гематологии Томской областной клинической больницы В.Ю. Гранкиной, заведующей лабораторией клинической иммунологии ГУЗ ЦМСЧ №81 ЗАТО Северск канд. мед. наук Т.Т. Радзивил, врачу-гематологу отделения гематологии Томской областной клинической больницы Е.Н. Кнутаревой, врачу-ординатору клиники инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрави канд. мед. наук Н.П. Чернышовой, с.н.с. ЦНИЛ ГОУ ВПО СибГМУ Росздрави канд. мед. наук Н.М. Шевцовой за проявленный интерес к работе, ценные теоретические и методические советы.