

Григорьева Екатерина Сергеевна

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

14.00.16 – патологическая физиология

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2007

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор

Рязанцева
Наталья Владимировна

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

Новицкий
Вячеслав Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Агафонов Владимир Иванович,
руководитель отдела экспериментального биомоделирования ГУ НИИ
фармакологии ТНЦ СО РАМН

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

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение
высшего профессионального образования «Омская государственная
медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и
социальному развитию»

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

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

В последние годы расшифрованы молекулярные механизмы реализации запрограммированной гибели клетки, опосредованные системами внутриклеточной и межклеточной сигнализации [Невзорова В.А. и соавт., 2001; Мойбенко А.А. и соавт., 2005; Тяжелова В.Г., 2005; Москалева Е.Ю., Северин С.Е., 2006; Орловская И.А. и соавт., 2006]. При этом цитокины считаются наиболее многочисленной группой биологически активных веществ, влияние которых на апоптоз интенсивно изучается. Так, ряд цитокинов (IFN- γ , TNF α , IL-1, IL-10) являются индукторами апоптоза как здоровых, так и злокачественно-трансформированных клеток [Meagher L.C. et al., 1996; Потапнев М.П., 2002; Бережная Н.М., 2005]. Вместе с тем выявлена большая группа медиаторов (IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IFN- α), действие которых способствует запуску эндогенной программы защиты клеток от апоптотической гибели [Невзорова В.А. и соавт., 2001; Потапнев М.П., 2002]. При этом эффект некоторых цитокинов может быть разнонаправленным и зависеть как от типа клеток, так и от особенностей их функционального состояния [Потапнев М.П., 2002].

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

формирование гемической и тканевой эозинофилии при патологических процессах разного генеза [Rothenberg M.E., 1999].

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

Цель исследования: установить роль нарушения цитокиноопосредованной регуляции апоптоза эозинофильных лейкоцитов в механизмах развития больших эозинофилий крови.

Задачи исследования:

1. Выявить роль нарушений апоптотической гибели эозинофильных лейкоцитов при формировании гиперэозинофилии крови, осложняющей течение лимфопролиферативных гематологических заболеваний и описторхоза.

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость. Полученные данные фундаментального характера о нарушении цитокиноопосредованного апоптоза эозинофилов у больных лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом раскрывают новые молекулярно-клеточные аспекты патогенеза больших эозинофилий крови. Результаты настоящего исследования

могут быть положены в основу разработки новой патогенетически обоснованной тактики коррекции гиперэозинофилии при гемобластозах и описторхозе.

Положения, выносимые на защиту:

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

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

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

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

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом по грантам Президента РФ для поддержки ведущих научных школ РФ, «Молекулярные основы нарушения гомеостаза клеток крови при актуальных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (НШ-4153.2006.7), а также результаты научно-исследовательских работ «Роль нарушений межклеточной кооперации в механизмах формирования больших эозинофилий крови» 2005-РИ-19.0/002/010 (государственный контракт № 02.442.11.7056 от 26.10.2005), «Молекулярные и клеточные основы управления реактивностью системы крови при актуальных заболеваниях инфекционной природы» 2006-РИ-112.0/001/384 (государственный контракт № 02.445.11.7419 от 09.06.2006 г.), выполненных в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники РФ на 2002-2006 годы».

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

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

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

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

Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, 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 20 пациентов с лимфогранулематозом (по МКБ-10 рубрика С81): из них 7 - со смешанно-клеточным вариантом заболевания (С81.2), 8 - с нодулярным склерозом (С81.1), 5 – с лимфоидным преобладанием (С81.0). Среди больных лимфогранулематозом, согласно классификации, принятой в 1971 г. в Ann Arbor, выделяли пациентов со II Бб стадией процесса (2 человека), III Аб стадией (8 пациентов) и III Бб стадией (10 больных). Верификация диагноза проводилась на основании данных морфологического и иммунофенотипического исследований гистологических препаратов (наличие в опухолевом очаге типичных многоядерных клеток Березовского-Штернберга с фенотипом CD15, CD30).

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

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

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

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

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

Анализ клинической картины у пациентов с тифоподобным вариантом течения острого описторхоза показал, что наиболее часто у пациентов выявлялся токсико-аллергический синдром (83%). Больные предъявляли

жалобы на общую слабость, головную боль, ознобы, повышенное потоотделение, боли в суставах и мышцах. При осмотре выявлялась легкая субиктеричность, экзантема. Диспепсический синдром (непереносимость жирной пищи, тошнота, горечь во рту, изжога, метеоризм) встречался у 63% пациентов. В большинстве случаев гепато- и спленомегалия, выявленные физикально, подтверждались результатами ультразвукового исследования. В свою очередь у лиц с гепато-холангитическим вариантом течения острого описторхоза преобладали симптомы, обусловленные поражением гепатобиллиарной системы (у 92%): боли в области правого подреберья, желтуха различной степени выраженности, значительное увеличение печени (на 4 см и более из под края реберной дуги). Симптомы Ортнера, Кера, Мюсси – положительные. Астеновегетативный синдром выявлялся у 32% пациентов. Гастроэнтероколитический вариант острой фазы описторхоза характеризовался жалобами на частый жидкий стул (79%), болями в животе (84%), метеоризмом (54%); тошнота и рвота были отмечены у 47%.

Вторую группу обследованных составили 32 больных хроническим описторхозом с выраженной клинической картиной (реинвазия, суперинвазия) (рубрика В-66 – описторхоз по МКБ-10). Верификацию диагноза проводили на основании данных клинико-эпидемиологического, инструментального и лабораторного исследований. Анамнестически у всех пациентов данной категории был определен примерный срок инвазии, оценивались жалобы, характер течения заболевания и объективные признаки. Проводился широкий спектр лабораторных исследований, включавший общий и биохимический анализ крови, иммуноферментный анализ, оценку иммунного статуса, дуоденальное зондирование и копроовоскопию.

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

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

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

Группу сравнения составили 20 пациентов с хронической описторхозной инвазией 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 1.

Таблица 1

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

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

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

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

Выделение эозинофильных гранулоцитов проводили с применением прерывистого градиента плотности Percoll («Amersham Biosciences AB», Швеция). Готовили серию растворов Percoll с плотностью 1,105; 1,095; 1,090; 1,081; 1,070 [Gartner I., 1980]. Выделенные эозинофилы крови ($2 \cdot 10^5$ в лунке) культивировали в 96-луночных иммунологических планшетах в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл

гентамицина и 2мМ/мл HEPES («Flow», GB), в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO₂.

Мононуклеары крови выделяли в градиенте плотности Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция) ($\rho=1,077 \text{ г/см}^3$). Для получения супернатантов выделенные клетки ресуспендировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640 («Вектор-Бест», Новосибирск), 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург), 0,3 мг/мл L-глутамина без митогена или с добавлением 10 мкг/мл фитогемагглютинина (ФГА) («Difco», Германия) для активации лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 1995]. Клеточные суспензии в количестве 1,5 мл инкубировали при 37°C на протяжении 18 ч. Для определения уровней IL-3, IL-5 и GM-CSF в супернатантах интактной и ФГА-стимулированной культур мононуклеарных лейкоцитов и eotaxin в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA). Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Biosource», Бельгия). Регистрацию результатов иммуноферментного анализа проводили с использованием фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой.

Регистрация апоптоза эозинофилов 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]. После выделения и культивирования клетки суспензировали ($1 \cdot 10^6$ в 1 мл) в аннексиновом буфере, содержащем аннексин V, меченный FITC, и через 15 мин подвергали проточной цитофлуориметрии. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Epics XL («Beckman Coulter», Франция) с аргоновым лазером. Проводилось определение следующих параметров: малого углового светорассеяния (FSC), характеризующего размер клетки, бокового светорассеяния (SSC), характеризующего цитоплазматические, а также мембранные особенности клетки, и показателя зеленой флуоресценции (FITC – 530 нм) в гейте эозинофильных клеток, выявляемого на FL1-канале. Использовали автоматическое программное обеспечение и методы сбора и анализа данных с высоким разрешением (1024 канала).

В рамках диссертационной работы проводили оценку реализации апоптотической реакции эозинофилов крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и у лиц, страдающих описторхозом, сопровождавшихся гиперэозинофилией, а также у здоровых доноров *in vitro* в условиях инкубации эозинофильных клеток в среде, лишенной ростовых факторов и с рекомбинантными формами эозинофилтропных цитокинов (IL-3, IL-5 и eotaxin). После выделения и культивирования эозинофилов описанным выше способом в отдельные пробы добавляли 10^{-8} г/мл рекомбинантного (r) IL-3 (r-IL-3) («Biosource», Бельгия), 10^{-8} г/мл r-IL-5 («Biosource», Бельгия), 10^{-8} г/мл r-eotaxin («Biosource», Бельгия).

Клетки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. Затем клетки окрашивали в буфере («Caltag», США), содержащем аннексин V - FITC. Регистрацию апоптоза осуществляли в аннексиновом тесте с помощью проточной лазерной цитофлуориметрии как указано выше.

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

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

С целью обнаружения связи между исследуемыми показателями проводили корреляционный анализ путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r). Методом множественной регрессии были рассчитаны коэффициенты β , определяющие степень зависимости между исследованными показателями [Гланц С., 1998; Боровиков В.П., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Широта распространения нозологических единиц, сопровождаемых гиперэозинофильным синдромом, обуславливает интерес современной медицинской науки к проблеме трактовки механизмов этого явления [Анаев Э.Х., 2002; Коровина Н.А. и соавт., 2002; Семенкова Е.Н. и соавт., 2004].

Интенсивное развитие молекулярной биологии в последние годы поставило вопрос о роли нарушения программированной гибели при различных патологических процессах. В частности, в литературе высказывалось мнение о том, что нарушение или дефекты апоптоза эозинофильных гранулоцитов могут лежать в основе формирования эозинофилии крови [Druilhe A. et al., 1996; Воробьев А.И., 2002]. На основании этого нами была произведена оценка программированной гибели эозинофилов у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями системы крови и описторхозом, ассоциированных с гиперэозинофилией.

В ходе нашего исследования у пациентов с гиперэозинофильной реакцией крови выявлялось снижение относительного содержания эозинофилов, находящихся на ранней стадии реализации апоптотической программы, при их культивировании в условиях полной питательной среды. Выявленные

изменения носили однонаправленный характер вне зависимости от нозологии. Исключение составили лица с хроническим описторхозом, у которых этот показатель не снижался до статистически значимого уровня ($p=0,054$).

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

В настоящее время в отношении эозинофилов наиболее хорошо изучено биологическое действие IL-5 (рис. 1). Он является одним из ключевых цитокинов, влияющим на образование, созревание, активацию и численность эозинофильных лейкоцитов [Lopez A.F. et al., 1988]. IL-5

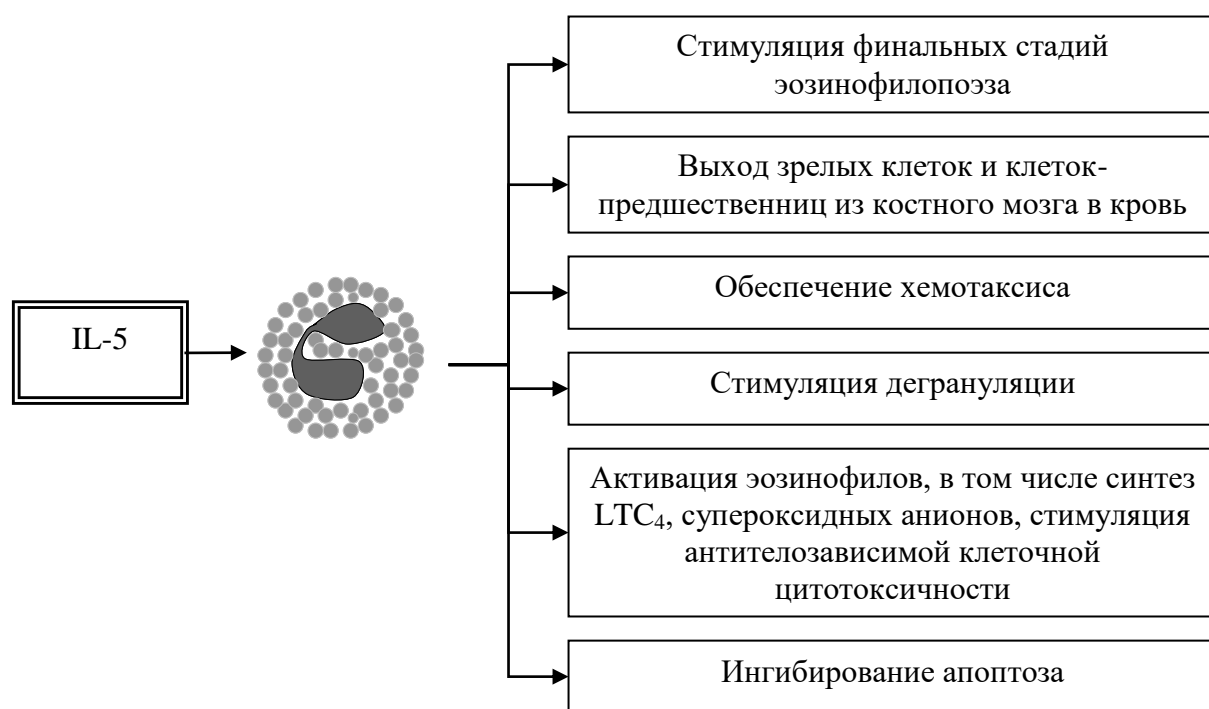


Рис. 1. Биологические эффекты IL-5 в отношении эозинофилов [по данным И.Д. Беклемишева, 1998; А.И. Воробьева, 2002; J.G. Zangrilli, 2002]

преимущественно воздействует на поздние стадии эозинофилопоэза, специфичен для лейкоцитов эозинофильного ряда, в отличие от GM-CSF, обеспечивающего дифференцировку нескольких кроветворных ростков [Clutterbuck E.J. et al., 1989; Adachi T., Alam R., 1998].

Наряду с различными биологическими свойствами, этот медиатор способствует пролонгированию жизни эозинофилов, ингибируя процесс их программированной гибели [Yamaguchi Y., 1988; Беклемишев Н.Д., 1998]. Этот цитокин, по данным литературы, является ключевым в развитии эозинофилии *in vivo*. Так, введение IL-5 обуславливает возникновение эозинофильной

реакции у различных животных [Iwama T. et al., 1992; Chung K.F., Barnes P.J., 1999]. Нами были получены данные, согласно которым у больных лимфопролиферативными заболеваниями, ассоциированными с эозинофильной реакцией крови, отмечалось достоверное увеличение (по сравнению с контролем и группой сравнения без эозинофилии) содержания IL-5. Так, при лимфоме Ходжкина уровень базальной продукции превышал аналогичный показатель контроля в среднем в 2,8 раза ($p=0,041$), а ФГА-индуцибельной в 3,15 раза ($p=0,041$); при множественной миеломе в 4,08 и 1,71 раза, соответственно ($p=0,035$ и $p=0,045$); при неходжкинских лимфомах в 2,03 и 1,78 раза, соответственно ($p=0,001$ и $p=0,014$), по сравнению со здоровыми донорами. В то же время у всех больных с гемобластозами вне зависимости от нозологии регистрировалось снижение индекса стимуляции IL-5 по сравнению с контрольным уровнем (рис. 2), что свидетельствует об угнетении

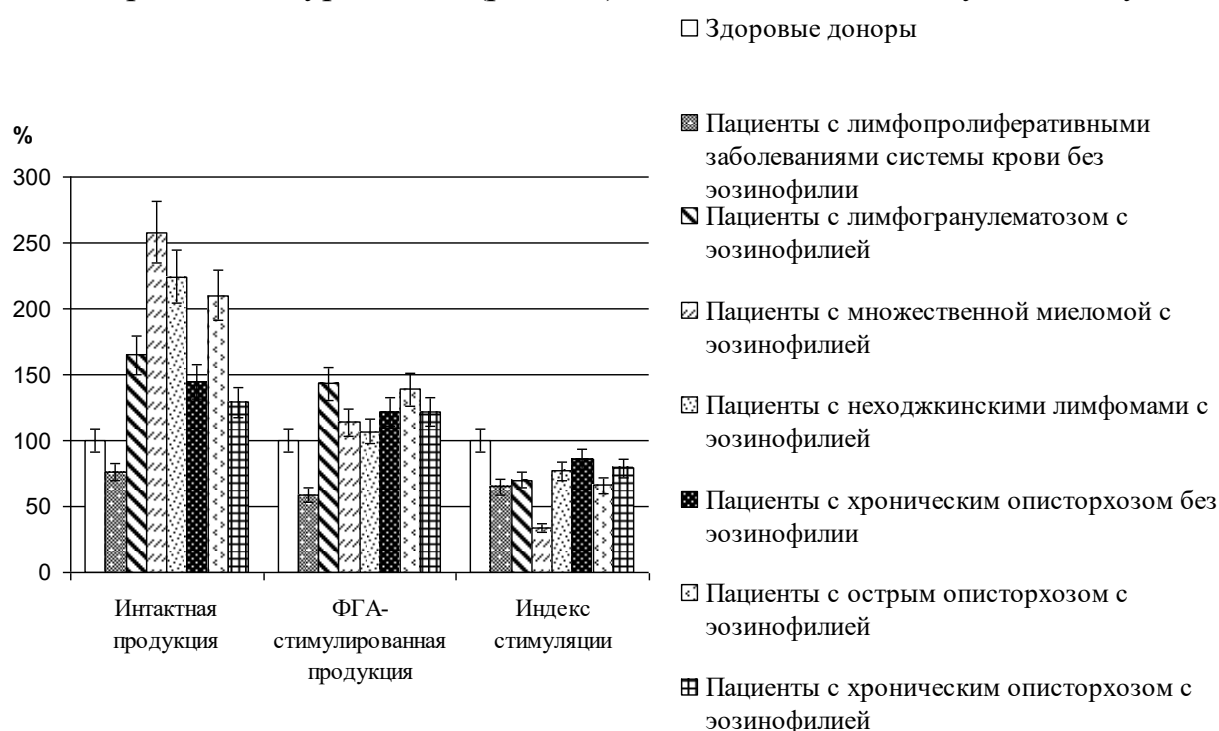


Рис. 2. Продукция IL-5 мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и описторхозом, сопровождавшихся эозинофилией

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

У пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией крови, регистрировалось статистически значимое повышение продукции мононуклеарами крови IL-5 по сравнению с аналогичным показателем у

больных без эозинофилии и здоровых лиц. Так, при остром описторхозе показатель базальной продукции ИЛ-5 в среднем на 87% превышал норму, а ФГА-инициированной - на 94% ($p=0,001$ и $p=0,029$, соответственно). Наряду с этим, конституциональная продукция вышеуказанного цитокина у пациентов с хроническим описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, превосходила в среднем на 60% таковую у больных группы сравнения без эозинофилии и на 71% у здоровых доноров ($p=0,002$ и $p=0,027$, соответственно), а ФГА-индуцибельная - в среднем на 46 и 38% ($p=0,014$ и $p=0,028$, соответственно). Как известно, одним из ключевых факторов в формировании механизмов иммунного ответа на антигены гельминтов является активация Th2-лимфоцитов [Озерецковская Н.Н., 2000]. Эта субпопуляция лимфоцитов обладает способностью вырабатывать различные цитокины, в том числе и ИЛ-5, высокий уровень продукции которого у пациентов с описторхозом может быть, в частности, объяснен этим фактом. Индекс стимуляции продукции ИЛ-5 у больных острым и хроническим описторхозом оказался сниженным, что свидетельствует об истощении резервных возможностей мононуклеаров крови вырабатывать указанный медиатор.

По данным корреляционного анализа у больных лимфогранулематозом, множественной миеломой и острым описторхозом были выявлены положительные функциональные связи между содержанием эозинофилов в крови и продукцией мононуклеарными лейкоцитами ИЛ-5 ($-r=0,620$, $p<0,05$; $-r=0,735$, $p<0,05$ и $-r=0,779$, $p<0,05$, соответственно), что раскрывает один из механизмов формирования гемической эозинофилии при данных нозологиях.

При проведении регрессионного анализа оказалось, что из исследованных нами параметров (ИЛ-3, ИЛ-5 и eotaxin) наибольший вклад в формирование эозинофилии крови при лимфогранулематозе и остром описторхозе принадлежит ИЛ-5 (соответственно, $\beta=1,07$, $p=0,15$ и $\beta=1,15$, $p=0,18$). Кроме того, в ходе проведенного нами корреляционного анализа были обнаружены отрицательные функциональные связи между уровнем спонтанного апоптоза эозинофильных клеток и продукцией эозинофилтропных цитокинов (ИЛ-3, ИЛ-5, eotaxin) при лимфогранулематозе и остром описторхозе, свидетельствующие о причастности этих медиаторов к ингибированию программированной гибели эозинофилов при данных заболеваниях (соответственно $-r=0,524$, $p<0,05$; $-r=0,701$, $p<0,05$ и $-r=0,538$, $p<0,05$ – при лимфогранулематозе; $-r=0,521$, $p<0,05$; $-r=0,562$, $p<0,05$ и $-r=0,556$, $p<0,05$ – при остром описторхозе).

В связи с этим в дальнейшем нами была предпринята попытка оценить выраженность апоптоза эозинофильных лейкоцитов, полученных у пациентов с большими эозинофилиями крови, в условиях инкубации клеток с r-ИЛ-5 (рис. 3).

У больных лимфопролиферативными гематологическими заболеваниями, ассоциированными с эозинофилией крови, фиксировалось снижение относительного и абсолютного содержания апоптотических клеток по сравнению с аналогичными показателями контроля: до $3,25\pm 0,35\%$ и $(0,110\pm 0,002)\cdot 10^9/\text{л}$ при лимфогранулематозе ($p=0,019$ и $p=0,001$, соответственно), до $3,14\pm 0,38\%$ и $(0,035\pm 0,001)\cdot 10^9/\text{л}$ при множественной миеломе ($p=0,015$ и $p=0,038$, соответственно) и до $3,38\pm 0,08\%$ и

$(0,070 \pm 0,001) \cdot 10^9/\text{л}$ при неходжкинских лимфомах ($p=0,021$ и $p=0,004$, соответственно). Однако значения изученных показателей не отличались от таковых в интактных культурах ($p>0,05$), что свидетельствует о снижении чувствительности эозинофильных лейкоцитов у пациентов со злокачественными заболеваниями системы крови к дополнительному воздействию ИЛ-5. В тоже время, у лиц с болезнью Ходжкина наблюдалось снижение абсолютного числа эозинофилов в апоптозе на 38% по сравнению с аналогичными параметрами спонтанного апоптоза ($p<0,01$).

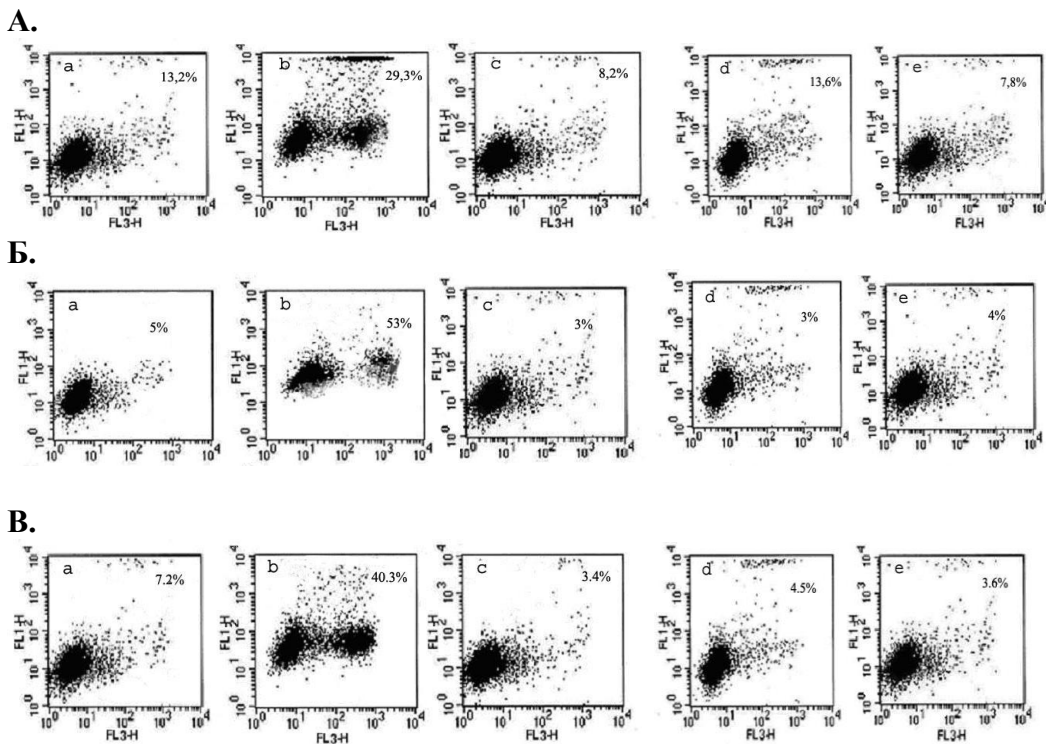


Рис. 3. Гистограммы проточно-цитометрического анализа, отражающие количество апоптотических эозинофилов крови, полученных у здорового донора (А), пациента с лимфомой Ходжкина (Б) и больного острым описторхозом (В), культивированных в питательной среде (а), при лишении ростовых факторов (бессывороточная среда) (b), при добавлении r-IL-5 (c), при добавлении r-IL-3(d), при добавлении r-eotaxin (e) (по данным проточно-цитометрического анализа)

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

видимому, обусловлено увеличением экспрессии рецепторов к указанному медиатору.

IL-3 является раннедействующим гемопоэтическим фактором, наряду с другими ростовыми факторами стимулирующий пролиферацию и дифференцировку всех ростков кроветворения [Гольдберг Е.Д. и соавт., 2001]. Источниками этого цитокина являются активированные Т-лимфоциты и тучные клетки [Arai K.I. et al., 1990]. В отношении эозинофилов IL-3 не только обеспечивает ранние этапы созревания клеток, но и участвует в их активации, повышает выброс белков гранул [Бережная Н.М. и соавт., 2005] (рис. 4).

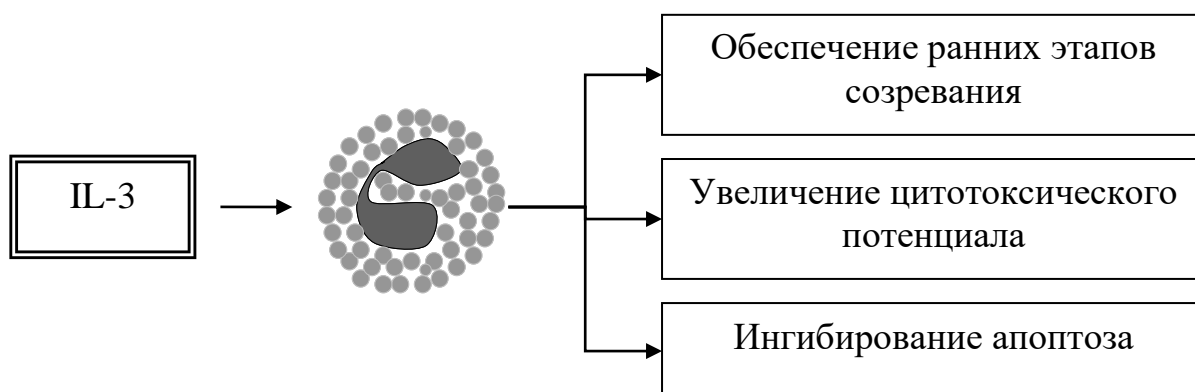


Рис. 4. Биологические эффекты IL-3 в отношении эозинофилов [по данным К.Ф. Chuhg, P.J. Barnes, 1999; А.И. Воробьева, 2002; J.G. Zangrilli, 2002]

Регулируя процесс программированной гибели, этот цитокин обладает способностью пролонгировать время жизни эозинофильных гранулоцитов [Rothenberg M.E. et al., 1988; Tai P.C. et al., 1991] и тучных клеток [Yanagida M., et al., 1995]. IL-3 стимулирует хемотаксис, дегрануляцию эозинофилов, синтез LTC₄, а также антителозависимую цитотоксичность [Zangrilli J.G., Peters S.P., 2000].

В проведенном нами исследовании у пациентов с лимфогранулематозом параметры базальной и ФГА-индуцибельной продукции IL-3 составили 21,91(16,02-39,08) пг/мл (p=0,031, p=0,021) и 40,16(30,87-48,77) пг/мл (p=0,023, p=0,012), соответственно; при множественной миеломе 34,25(28,34-44,46) пг/мл (p=0,034, p=0,030) и 32,10(30,09-40,70) пг/мл (p=0,054, p=0,030) соответственно; при неходжкинских лимфомах 29,68(9,60-33,71) пг/мл (p=0,041, p=0,011) и 30,22(10,14-36,40) пг/мл (p=0,051, p=0,031), соответственно, значительно превышая аналогичные показатели контроля и группы сравнения без эозинофилии. При этом значения индекса стимуляции секреции этого медиатора был ниже нормы по сравнению с его уровнем у здоровых доноров (рис. 5).

В свою очередь при остром описторхозе продукция мононуклеарами крови IL-3 в интактной пробе в среднем в 2,0 раза превышала норму, а в ФГА-стимулированной - в 1,4 раза (p=0,033 и p=0,042, соответственно). У больных хроническим описторхозом, сопровождавшемся эозинофилией, уровень базальной и ФГА-иницированной продукции IL-3 не отличался от аналогичных значений у здоровых доноров (p=0,199 и p=0,841) и у пациентов группы сравнения (p=0,071 и p=0,060). Значения индекса стимуляции

указанного медиатора у пациентов с острым и хроническим описторхозом оказались сниженными, что свидетельствует об истощении потенциала мононуклеаров секретировать ИЛ-3.

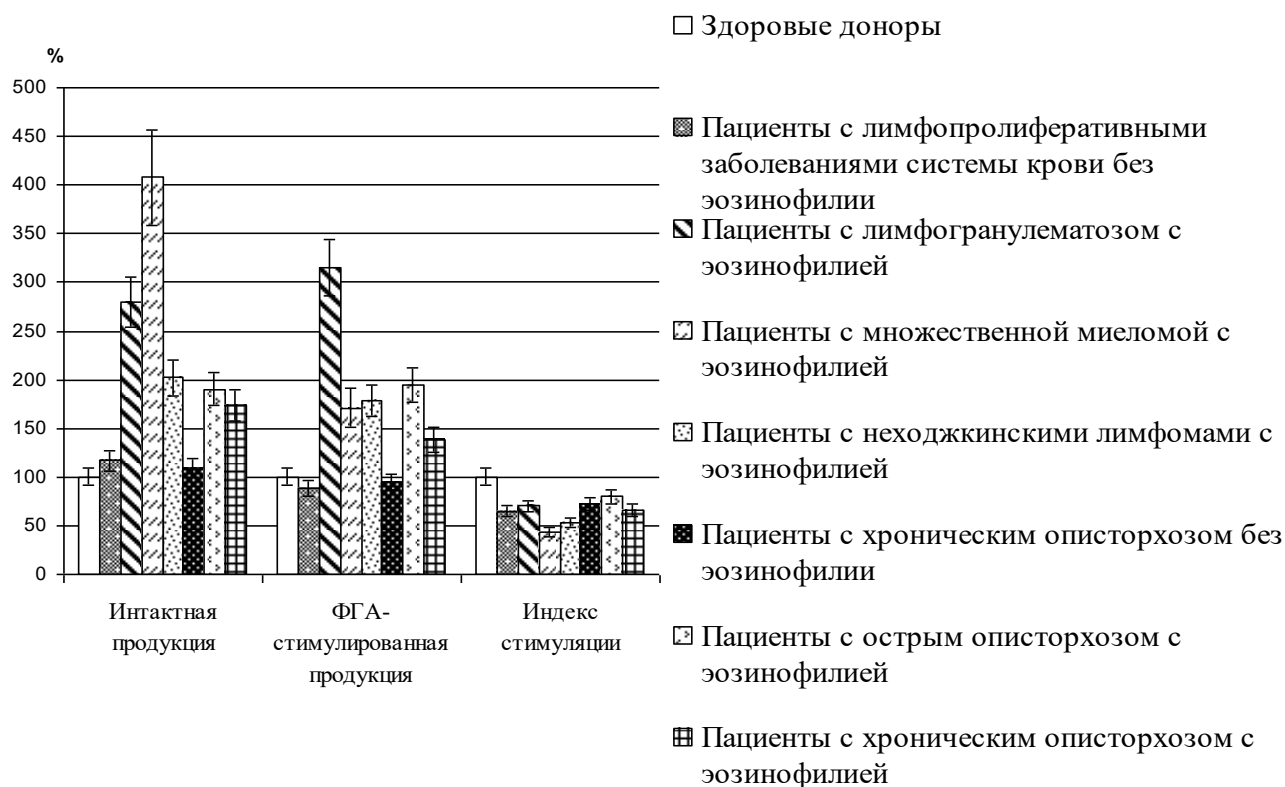


Рис. 5. Продукция ИЛ-3 мононуклеарными лейкоцитами крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и описторхозом, сопровождавшихся эозинофилией

По данным корреляционного анализа у больных лимфогранулематозом, множественной миеломой и острым описторхозом были выявлены положительные функциональные связи между содержанием эозинофилов в крови и продукцией мононуклеарными лейкоцитами ИЛ-3 ($-r=0,520$, $p<0,05$; $-r=0,531$, $p<0,05$ и $-r=0,560$, $p<0,05$, соответственно), что раскрывает один из механизмов формирования гемической эозинофилии при данных нозологиях.

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

При инкубации эозинофильных гранулоцитов, полученных у больных описторхозом, *in vitro* в среде с r-ИЛ-3 отмечалось снижение (по сравнению с

контролем) относительного числа клеток, экспрессирующих на своей мембране фосфатидилсерин: в 3,1 раза у пациентов с острым описторхозом и в 2,6 раза у лиц с хроническим описторхозом ($p=0,019$ и $p=0,028$, соответственно). В то же время нами было отмечено снижение (по сравнению с уровнем их спонтанной гибели) относительного и абсолютного количества аннексин-позитивных клеток, полученных у пациентов с острым описторхозом, и у лиц, страдающих хроническим описторхозом (в 1,7 и 1,4; 1,9 и 2,5 раза ($p<0,05$ и $p<0,05$, $p<0,05$ и $p<0,01$, соответственно). Вероятно, эозинофилы пациентов с описторхозом имеют повышенную экспрессию клеточных рецепторов к IL-3. Повышенная чувствительность эозинофильных лейкоцитов больных описторхозом к действию IL-3 и IL-5 обуславливает не только пролонгированное пребывание клеток в кровотоке, но и стимуляцию эозинофилопоэза, высвобождения зрелых эозинофилов из костного мозга, а также способствует активации, интенсификации механизмов микробицидности этих эффекторных клеток, что вносит существенный вклад в борьбу макроорганизма с гельминтами.

В изучении механизмов формирования эозинофилии крови особый интерес представляет роль eotaxin - цитокина, специфично действующего в отношении эозинофильных гранулоцитов. Этот хемокин CC-семейства привлекает в очаг аллергического воспаления исключительно эозинофилы, что было показано на различных моделях *in vivo*, причем этот эффект усиливается в присутствии IL-5 [Collins P.D. et al., 1995]. Синергизм этих цитокинов объясняется тем, что IL-5 стимулирует высвобождение зрелых клеток из костного мозга, а eotaxin обуславливает их направленную миграцию в ткани [Rollins B.J., 1997; Palframan R.T. et al., 1998]. Eotaxin также является хемоаттрактантом для Th2 лимфоцитов и базофилов, увеличивает высвобождение последними гистамина, а также синтез LTC₄ [Forssmann U., et al., 1997] (рис. 6). Основными продуцентами этого хемокина являются эпителиальные и эндотелиальные клетки, а также сами эозинофилы [Humbles A. A., 1997; Minshall E., 1997; Фрейдлин И.С., 2001].

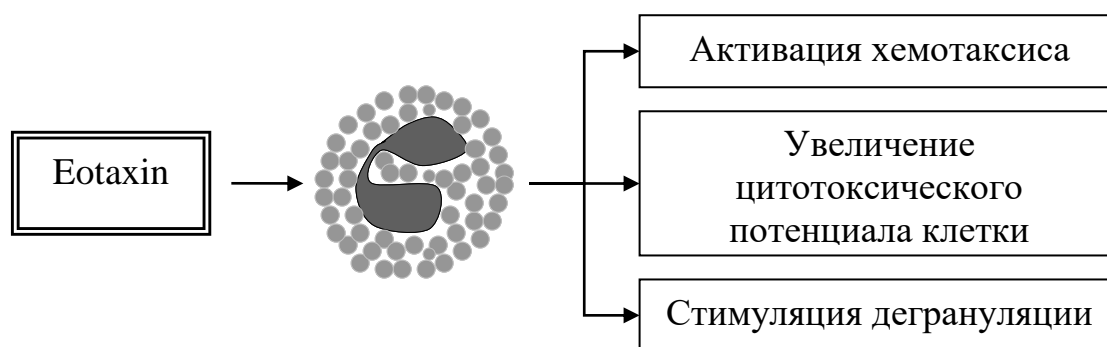


Рис 6. Биологические эффекты eotaxin в отношении эозинофилов [по данным K.F. Chuhg, P.J. Barnes, 1999; M.E. Rothenberg, 1999; C. Murdoch, A. Finn, 2000]

У больных злокачественными заболеваниями системы крови, ассоциированными с формированием эозинофильной реакции, значимое увеличение (по сравнению с контролем и группой сравнения без эозинофилии)

концентрации eotaxin регистрировалось лишь у пациентов с лимфомой Ходжкина (в среднем в 1,9 и 2,4 раза, $p=0,019$ и $p=0,012$, соответственно). У лиц, страдающих множественной миеломой и неходжкинскими лимфомами, достоверных различий тестируемого параметра по сравнению с нормой выявлено не было ($p=0,065$ и $p=0,059$). В проведенном нами исследовании содержания eotaxin в сыворотке крови у пациентов с описторхозом, сопровождавшимся эозинофилией, регистрировалось статистически значимое повышение концентрации указанного хемокина относительно аналогичного параметра у здоровых индивидуумов.

Так, при остром описторхозе содержание eotaxin превышало норму в среднем на 27%, а при хроническом описторхозе, ассоциированном с эозинофильной реакцией, - на 20% ($p=0,003$ и $p=0,045$, соответственно). Следует отметить, что концентрация eotaxin в сыворотке крови у больных острым и хроническим описторхозом с эозинофилией не имела достоверных отличий от аналогичного показателя в группе сравнения без эозинофилии ($p=0,061$ и $p=0,112$, соответственно) (рис. 7). Повышение уровня eotaxin у обследованных больных с гиперэозинофилией, с одной стороны, может быть связано со значительным увеличением в крови количества эозинофилов, обладающих способностью самостоятельно секретировать этот хемокин, а, с другой стороны, может быть опосредовано влиянием IL-4, который стимулирует mRNA eotaxin в клетках-продуцентах, что ведет к увеличению содержания этого медиатора [Mochizuki M. et al., 1999].

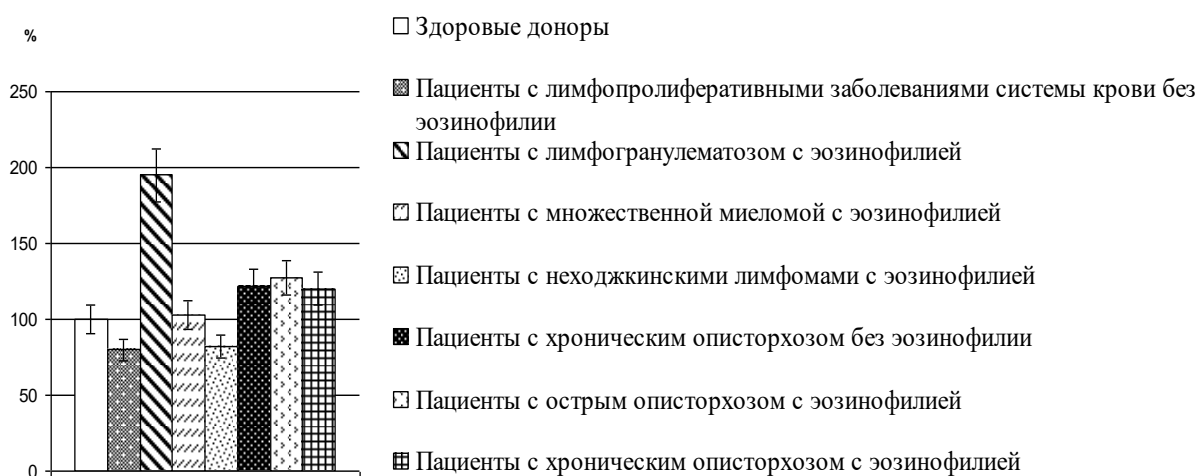


Рис. 7. Концентрация eotaxin в сыворотке крови у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями и описторхозом, сопровождавшимся эозинофилией

Нами были установлены позитивные связи между концентрацией eotaxin и относительным содержанием эозинофилов в крови у лиц, страдающих лимфомой Ходжкина, и у пациентов с острым описторхозом ($r=0,502$, $p<0,05$ и $r=0,790$, $p<0,05$), что свидетельствует о причастности данного хемокина к развитию эозинофильной реакции крови при этих патологиях.

При анализе данных влияния γ -eotaxin на апоптотическую реакцию эозинофилов, полученных у пациентов со злокачественными заболеваниями

системы крови, ассоциированными с эозинофилией, обращало внимание достоверное снижение (по сравнению с нормой) уровня относительного и абсолютного числа клеток (в 2,0 и 12,1 раза - при лимфогранулематозе ($p=0,015$ и $p=0,001$, соответственно), в 2,1 и 2,7 раза - при множественной миеломе ($p=0,004$ и $p=0,044$, соответственно), и в 2,7 и 7,2 раза - при неходжкинских лимфомах ($p=0,001$ и $p=0,011$, соответственно)). В то же время данный показатель не имел достоверных различий по сравнению с уровнем спонтанной гибели эозинофилов ($p>0,05$). У больных злокачественной гранулемой абсолютное количество апоптотически измененных эозинофилов в среде с γ -eotaxin было снижено в 1,5 раза по сравнению с показателями интактного уровня ($p<0,05$). Данный факт, по-видимому, можно объяснить функциональной неполноценностью эозинофильных лейкоцитов вследствие увеличения митотического индекса и укорочения клеточного цикла на ранних этапах их созревания. Это приводит к появлению в кровотоке эозинофильных клеток, не достигших зрелости и не способных адекватно реагировать на про- и антиапоптотические стимулы, что ведет к нарушению реализации их запрограммированной гибели.

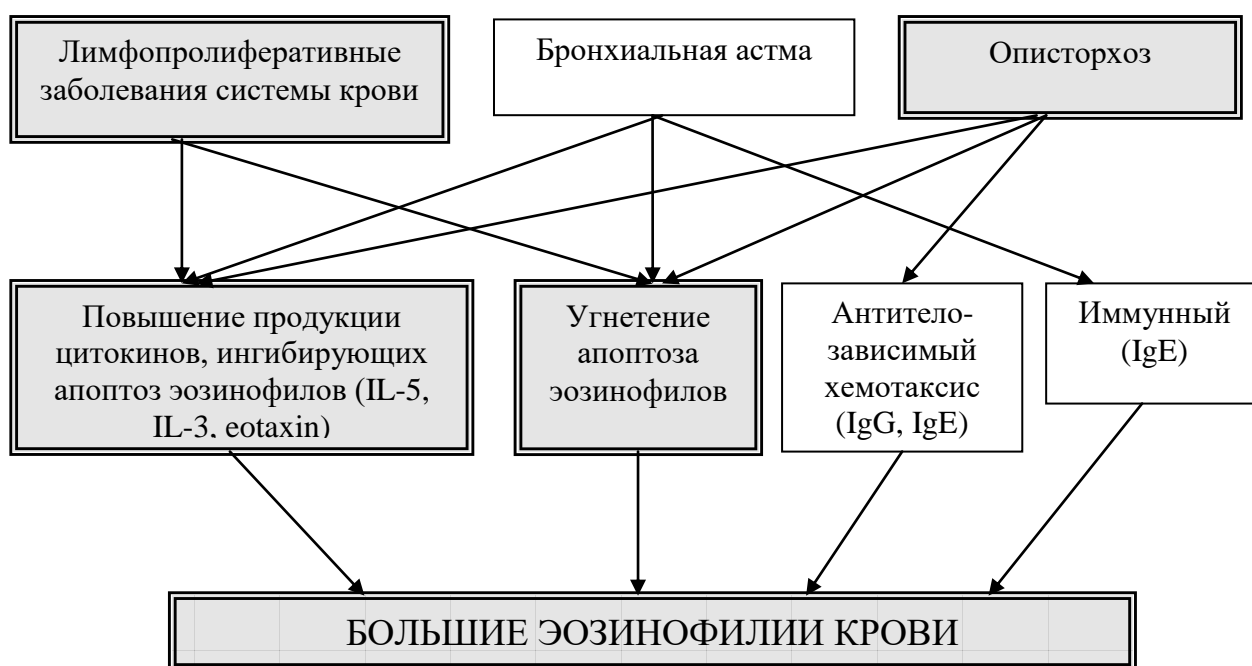


Рис. 8 . Механизмы развития больших эозинофилий крови при патологических процессах разного генеза [по данным A. Druilhe et al., 1996; M. Kato et al., 1999; A.M. Vignola et al., 1999; A.S. Jang et al., 2000; И.А. Деева, 2004 и собственным данным (выделено)]

При инкубации эозинофилов, выделенных у больных описторхозом, в среде с γ -eotaxin также отмечалось достоверное снижение (по сравнению со здоровыми донорами) относительного числа клеток в апоптозе при остром описторхозе в 2,3 раза, при хроническом - в 1,8 раза ($p=0,011$ и $p=0,020$, соответственно). Наряду с этим было обнаружено уменьшение относительного

и абсолютного числа апоптотически измененных эозинофилов по сравнению с уровнем спонтанного апоптоза (в 2,0 и 2,4 раза - у больных острым описторхозом ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно), в 2,2 и 1,8 раза - при хроническом описторхозе ($p < 0,05$ и $p < 0,05$, соответственно)).

При оценке характера апоптотической гибели эозинофилов, полученных у обследованных пациентов с большими эозинофилиями крови, при культивировании их *in vitro* в бессывороточной среде отмечалось значимое повышение относительного числа клеток, находящихся на ранней стадии реализации танатогенной программы по сравнению с показателями контроля и интактной культуры.

Таким образом, подводя итог, следует отметить, что у обследованных нами пациентов с гемобластозами и описторхозом имеет место нарушение цитокиноопосредованной программированной гибели эозинофильных лейкоцитов, что обуславливает, наряду с другими факторами, развитие больших эозинофилий крови у данных больных (рис. 8).

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Цитокинопосредованные механизмы формирования синдрома эозинофилии при гемобластозах / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.Н. Кнутарева, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова // Бюллетень сибирского отделения Российской Академии медицинских наук. – 2007. - №2. – С. 153 - 159.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФГА - фитогемагглютинин

CD – поверхностный кластер дифференцировки

FITC - флюоресцеинизотиоцианат

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IFN - интерферон

Ig - иммуноглобулин

IL – интерлейкин

mRNA - матричная рибонуклеиновая кислота

LTC₄ – лейкотриен C₄

Th – Т-хелперы

TNF - фактор некроза опухоли

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава д-ру мед. наук, профессору А.В. Лепехину, заведующей лабораторией клинической иммунологии ГУЗ ЦМСЧ №81 ЗАТО Северск канд. мед. наук Т.Т. Радзивил, врачу-ординатору клиники инфекционных болезней ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава канд. мед. наук Н.П. Чернышовой, с.н.с. ЦНИЛ ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава канд. мед. наук Н.М. Шевцовой за проявленный интерес к работе, ценные теоретические и методические советы.