

На правах рукописи

Суворова Евгения Владимировна

**РОЛЬ ЭОЗИНОФИЛОВ В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ
ОПИСТОРХОЗА**

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, профессор Логвинов Сергей Валентинович,
заведующий кафедрой гистологии, эмбриологии и цитологии ГОУ ВПО СибГМУ
Росздрава

Ведущая организация: ГУ НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН,
г. Красноярск

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. Описторхоз - пероральный биогельминтоз, вызываемый трематодой семейства Opisthorhidae. Социальная значимость патологии, обусловленной инвазией *Opisthorhis felineus*, велика в связи с широкой распространенностью этого гельминтоза и развитием таких тяжелых осложнений, как аутоиммунные нарушения, первичный рак печени и поджелудочной железы, atopические заболевания [Зуевский В.П., Солтыс Т.В., 2001]. По данным ВОЗ [2003], описторхозом поражено около 17 млн. человек, а риску заражения подвержено свыше 350 млн. человек, проживающих в 13 странах мира [Токмалев А.К., 2003]. Очаги описторхоза в России имеются в бассейнах рек Обь, Иртыш, Енисей, Волга, Кама, Днепр, Урал, а также Северная Двина. Регион Западной Сибири признан в числе чрезвычайно напряженных в мире очагов описторхозной инвазии в среднем течении Оби и низовьях Иртыша пораженность местного населения достигает 70-80% и даже - 90%. Данные многолетних исследований позволяют обсуждать основные клинические проявления и механизмы, определяющие ответ человека при инвазии *Opisthorchis felineus* [Bousquet J. et al., 1990; Анаев Э.Х. и соавт., 1994; Giembycz M.A., Lindsay M.A., 1999; Лысенко А.Я., 1994; Котелкин А.Т. и соавт., 1996; Беклемишев Н.Д., 1998].

На первый план в патогенезе описторхоза выступают гуморальные и клеточные реакции со взаимно активирующими процессами, в которых принимают участие макрофаги, эозинофилы, тучные и другие иммунокомпетентные клетки, синтезирующие различные хемотаксические факторы. Особую роль в реализации противопаразитарного иммунитета играют эозинофилы. Эозинофильные гранулоциты при гельминтозах выполняют различные функции, включая фагоцитоз многочисленных комплексов антиген-антитело, модуляцию гиперчувствительности и киллинг гельминтов *in vitro* при участии IgG-антител [Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 2000].

Процессы созревания, миграции и активации лейкоцитов эозинофильного ряда опосредованы действием цитокинов, вырабатываемых преимущественно Th2-лимфоцитами (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF). Каждый цитокин связывается со своим специфическим рецепторным комплексом. Благодаря широкому разнообразию, как рецепторных структур, так и выделяемых ими продуктов, эозинофилы обладают уникальными возможностями для участия в регуляции функций иммунокомпетентных клеток, фагоцитозе, репарационных процессах, презентации антигена и др. [Бережная Н.М., 2005]. Вместе с тем, эозинофил остается одной из наиболее агрессивных эффекторных клеток воспаления [Гриншпун Г.Д., 1983; Джальчинова В.Б., 1999; Анаев Э.Х., 2002]. Повышение содержания компонентов гранул эозинофильных лейкоцитов, обладающих протеолитической активностью, и напряжение кислородзависимых механизмов цитотоксичности обуславливают формирование высокого микробицидного потенциала этих клеток, действие которого может реализоваться не только в отношении инородных субстанций, но и окружающих тканей.

Известно, что мембрана эозинофилов презентрует разнообразные антигенные структуры, в частности, высоко- и низкоаффинные рецепторы для IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF, количество которых значительно возрастает на мембране клетки после их активации антигенными детерминантами. Вместе с тем эозинофилы человека экспрессируют большое число рецепторов CCR3 для эотаксина [Тотолян А.А., 2001; Munoz N.M., Leff A.R., 2006]. По мнению многих исследователей, именно дисбаланс продукции иммунорегуляторных цитокинов, ориентированный на Th2-тип иммунного ответа, может иметь важное значение в реализации патогенеза данного гельминтоза [Беклемишев Н.Д., 1998; Chung K.F., Barnes P.J., 1999; Озерецковская Н.Н., 2000; Анаев Э.Х., 2002; Бережная Н.М., 2005]. При этом важное значение приобретает нарушение кооперации эффекторных клеток – лимфоцитов и эозинофилов. Не вызывает сомнения тот факт, что существующая между клетками иммунной системы и лейкоцитами эозинофильного ряда взаимонаправленность эффектов обусловлена, с одной стороны, иммунорегулирующим действием моноклеарных лейкоцитов, что определяет эозинофилы как эффекторное звено иммунных реакций, а с другой - способностью ацидофильных гранулоцитов синтезировать широкий спектр медиаторов, указывая на их иммуномодулирующую функцию [Васильева Г.И., 2000; Бережная Н.М., 2005]. Дизрегуляция данных эффектов может обуславливать сдвиг процессов созревания, дифференцировки и активации эозинофилов, что приводит к их длительному пребыванию в периферической крови при описторхозе.

Следует признать, что в настоящее время механизмы и биологическая целесообразность развития эозинофилии крови при описторхозе изучены недостаточно, а имеющиеся в литературе данные в рамках обсуждаемой проблемы носят весьма неоднозначный характер. В связи с этим принципиально важным становится исследование механизмов цитокинопосредованной регуляции структурно-метаболического статуса эозинофилов, что позволит расширить представления о механизмах развития эозинофилии. Движущей силой пристального изучения механизмов действия ключевых медиаторов на клеточные системы является многообещающая перспектива их клинического использования для коррекции патологических состояний, характеризующихся выраженным дисбалансом кооперативного взаимодействия клеток.

Цель исследования: оценить роль эозинофильных гранулоцитов в иммунопатогенезе описторхоза с позиции нарушения механизмов цитокинопосредованного взаимодействия эозинофилов и моноклеарных клеток.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи исследования:

1. Выявить общие закономерности и особенности изменений морфо-функционального статуса эозинофилов при остром и хроническом описторхозе.
2. Оценить уровень эотаксина в сыворотке крови и продукцию моноклеарными лейкоцитами периферической крови цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF), регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и

активации эозинофильных клеток, а также презентацию рецепторов к IL-3, IL-5 и CCR3 лейкоцитами эозинофильного ряда у пациентов в острую и хроническую фазу описторхоза.

3. Установить роль нарушений межклеточного взаимодействия эффекторных клеток крови (мононуклеарные клетки, эозинофилы) в механизмах развития эозинофилии при описторхозе.

Научная новизна. Впервые получены знания фундаментального характера о ключевой роли эозинофилов в иммунопатогенезе описторхоза и роли нарушения межклеточного взаимодействия клеток крови (эозинофильных гранулоцитов, мононуклеарных лейкоцитов) в механизмах развития эозинофилии при описторхозе. В результате исследования эффекторных клеток крови впервые было показано, что изменения реагирования системы иммунитета при остром и хроническом описторхозе, сопровождающемся большой эозинофилией крови (более 15%), характеризуются супрессией иммунного ответа (дефицит Т-клеточного звена иммунной системы); дисбалансом продукции цитокинов, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофильных клеток (увеличение продукции IL-3, IL-5, IL-4 и GM-CSF); изменением презентации эозинофилами IL-3R, IL-5R и CCR3 и, как следствие, нарушением кооперативного взаимодействия мононуклеарных лейкоцитов и эозинофилов. Установлен факт выраженного повышения уровня эотаксина, имеющего важное значение в регуляции дифференцировки и пролиферации ацидофильных гранулоцитов. Впервые показано повышение содержания компонентов гранул эозинофилов крови у больных описторхозом, обладающих протеолитической активностью, что, наряду с усилением фагоцитарной активности и наличием клеток с признаками дегрануляции и цитолиза, свидетельствует о напряжении механизмов микробицидности.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые изучена роль эозинофилспецифичных цитокинов и их рецепторов в кооперации эозинофилов и мононуклеарных клеток при описторхозе, а также рассмотрена морфофункциональная характеристика эозинофильных гранулоцитов у больных острым и хроническим описторхозом, ассоциированным с эозинофилией. Полученные в ходе исследования данные фундаментального характера о механизмах развития эозинофилий крови при данном гельминтозе с позиции межклеточных взаимодействий могут быть положены в основу разработки новой тактики диагностики и иммунокоррекции этого гельминтоза, профилактики и лечения последствий пролонгированной эозинофилии крови.

Положения, выносимые на защиту:

1. При остром и хроническом гельминтозе, обусловленном инвазией *Opisthorchis felinus*, ассоциированным с эозинофилией, ацидофильные гранулоциты претерпевают выраженные нарушения морфологических свойств и отмечается усиление кислороднезависимых и кислородзависимых процессов киллинга эозинофилов, что обуславливает формирование их высокого цитотоксического потенциала.

2. При остром и хроническом описторхозе, сопровождающемся эозинофилией, выявлен выраженный дисбаланс цитокинпродуцирующей функции мононуклеаров периферической крови (увеличение продукции мононуклеарами IL-3, IL-5, IL-4 и GM-CSF), повышение уровня эотаксина в сыворотке крови и рецепторэкспрессирующей способности лейкоцитов эозинофильного ряда в условиях дефицита Т-клеточного звена иммунной системы.

3. В реализации феномена эозинофилии при описторхозе имеет место нарушение цитокинопосредованной межклеточной кооперации эффекторных клеток крови (мононуклеарных лейкоцитов и эозинофилов).

Апробация и реализация работы. Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на 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), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социально-экологические проблемы природопользования в Центральной Сибири» (Красноярск, 2006).

В работе приводятся результаты исследований, поддержанных Советом при Президенте РФ для поддержки ведущих научных школ РФ, «Молекулярные основы нарушения гомеостаза клеток крови при актуальных заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы» (НШ-4153.2006.7), а также результаты научно-исследовательской работы «Роль нарушений межклеточной кооперации в механизмах формирования больших эозинофилий крови» 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.), выполненной в рамках Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, из которых 5 – в центральных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 20 таблицами. Библиографический указатель включает 252 источника (119 - отечественных и 133 - иностранных).

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе представлены результаты комплексного обследования 116 человек (56 мужчин и 60 женщин в возрасте от 18 до 60 лет) с острым и хроническим описторхозом. Больные находились на стационарном лечении в инфекционном отделении госпитальных клиник им. А.Г.Савиных ГОУ ВПО

СибГМУ Росздрава (главный врач – Заслуженный врач РФ, к.м.н. В.М. Шевелев, заведующая отделением – к.м.н., доцент Н.С. Бужак). Набор клинического материала осуществлялся при непосредственном участии 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.

Все обследованные больные были разделены на две группы. Клинически и анамнестически у всех обследованных лиц были исключены обострение хронических воспалительных процессов, наследственные и психические болезни, злоупотребление алкоголем и наркотическая зависимость, а также другая инфекционная патология и инвазия иными гельминтами. Пациенты были обследованы вне проведения антигельминтной терапии (у больных хроническим описторхозом в 95% случаев заболевание было выявлено впервые, у 5% больных в анамнезе - курс дегельминтизации бильтрицидом).

Первую группу составили 46 пациентов с острым описторхозом (по МКБ-10 рубрика В66 – описторхоз). Подавляющее большинство составили новоселы Томской области – 40 человек (87%), из них 29 пациентов заразились описторхозом при проживании в эпидемическом очаге до 1 года. Диагноз острого описторхоза основывался на данных эпидемиологического анамнеза: пребывание больного в местности, не благополучной по описторхозу; употребление неправильно обработанной рыбы семейства карповых; острое начало болезни, сопровождавшееся высокой температурой, аллергическими проявлениями, болями в эпигастральной области и правом подреберье; характерные изменения 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.

В соответствии с классификацией описторхоза [Ахрем-Ахремович Р.М., 1963; Белов Г.Ф., Фейгинова Ф.А., 1969; Винников М.Э., 1971], были выделены следующие клинические группы: 1) больные с тифоподобным вариантом – 16 человек; 2) больные с гепато-холангитическим вариантом – 20 человек; 3) больные с гастроэнтерологическим вариантом течения заболевания – 10 человек.

Во вторую группу были включены 50 пациентов с хроническим описторхозом с выраженной клинической картиной (реинвазия, суперинвазия), сопровождавшейся гиперэозинофильной реакцией (>15%).

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; пациентов с холангитическим циррозом печени не было. 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.

Таблица 1

Распределение здоровых доноров и пациентов с описторхозом в соответствии с использованными методами исследования

Методы исследования	Группы обследованных		
	Здоровые доноры	Пациенты с острым описторхозом	Пациенты с хроническим описторхозом
Определение показателей лейкоцитарного звена периферической крови (общее количество лейкоцитов, абсолютное и относительное содержание эозинофилов и лимфоцитов)	25	46	50
Определение содержания лизосомальных катионных белков и пероксидазы в эозинофильных гранулоцитах цитохимическим методом	23	40	40
Определение фагоцитарной активности эозинофилов периферической крови в НСТ-тесте	20	35	38
Изучение особенностей морфологии эозинофилов в среде с антигеном <i>O. felinus</i>	22	32	35
Оценка количества эозинофилов, несущих рецепторы к ИЛ-3, ИЛ-5 и эотаксину, методом проточной цитофлуориметрии	15	15	16
Определение количества лимфоцитов крови, презентующих CD3 ⁺ -, CD4 ⁺ -, CD8 ⁺ - и CD22 ⁺ -маркёры, иммуноцитохимическим методом	20	20	20
Исследование содержания эозинофилспецифичных цитокинов в супернатантах культур мононуклеарных лейкоцитов и уровня эотаксина в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа	12	15	15

Проводился широкий спектр лабораторных исследований, включавший общий и биохимический анализы крови, иммуноферментный анализ (титр IgG-

антител к антигенам *O.felineus*), оценку иммунного статуса, дуоденальное зондирование и копроовоскопию.

Группу сравнения составили 20 пациентов с хроническим гельминтозом, обусловленным инвазией *O.felineus*, без эозинофилии крови с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту. В контрольную группу были включены 25 здоровых доноров с аналогичными характеристиками по полу и возрасту, не предъявлявшие на момент обследования жалоб соматического профиля.

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

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

Выделение эозинофильных гранулоцитов проводили с применением прерывистого градиента плотности перколла («Amersham Biosciences AB», Швеция). Готовили серию растворов перколла с плотностью 1,105; 1,095; 1,090; 1,081; 1,070 [Gartner I., 1980]. Выделенные эозинофилы периферической крови ($2 \cdot 10^5$ в лунке) культивировали в 96-луночных иммунологических планшетах в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 0,3 мг/мл L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 2мМ/мл HEPES («Flow», GB), в течение 18 ч при температуре 37°C и 5% CO₂. В последующем проводили оценку морфофункционального статуса лейкоцитов эозинофильного ряда при помощи цитохимических методов исследования (рис.1).

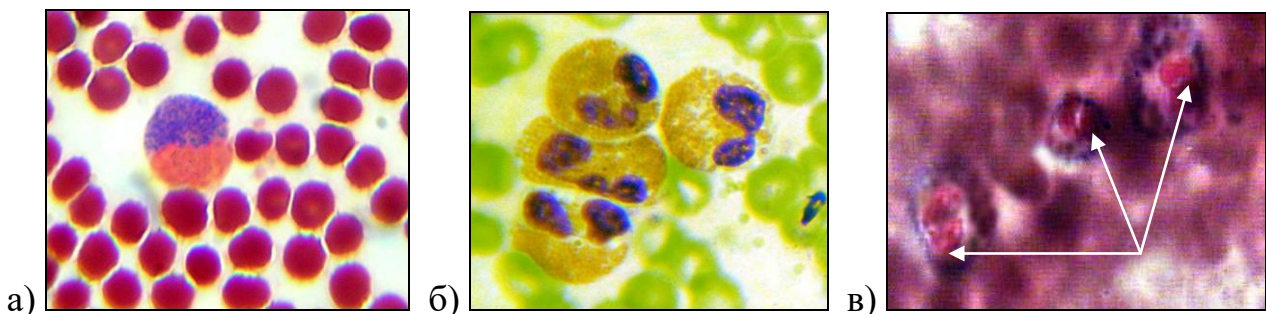


Рис. 1 Содержание внутриклеточных эозинофильных катионных протеинов (а) и пероксидазы (б) в эозинофилах периферической крови. Диформазан-позитивные эозинофилы (в)

Содержание ферментных катионных протеинов в эозинофилах периферической крови определяли цитохимическим методом М.Г. Шубича [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]. Для этого использовали стандартные «Тиатоп-стрип» тестовые системы производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Фагоцитарную активность эозинофильных гранулоцитов периферической крови оценивали методом J.S. Steward et al. в модификации

Б.С. Нагоева. Принцип метода заключается в поглощении эозинофилами нитросинего тетразолия (НСТ) и восстановлении его в формазан, выявляемого в цитоплазме клеток в виде гранул синего цвета [Меньшиков В.В., 1987] (рис. 1в).

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови по CD-маркерам (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ и CD22⁺) проводили иммуноцитохимическим методом [Тотолян А.Н. и соавт., 2001] с использованием набора реагентов фирмы «Dako» (Дания). Результаты выражали в процентных и абсолютных значениях.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови было основано на разделении популяций клеток крови в градиенте плотности. В качестве градиента плотности использовали 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-глутамин 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 °С и 5% CO₂ на протяжении 18 ч. Для определения уровней IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF в супернатантах интактной и ФГА-стимулированной культур мононуклеарных лейкоцитов и эотаксина в сыворотке крови использовали твердофазный иммуноферментный «сэндвичевый» метод (ELISA). Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили согласно инструкциям, предлагаемым производителями тест-систем («Procon», Россия; «Biosource», Бельгия). Учет результатов иммуноферментного анализа проводили с использованием фотометра для микропланшетов «Multiscan EX» («ThermoLabSystems», Финляндия) при длине волны 450 нм. Концентрацию цитокинов вычисляли по калибровочной кривой.

Для определения уровня презентации рецепторов к IL-3, IL-5 и эотаксину (CCR3) в интактной и стимулированной в условиях инкубации с рекомбинантными белками (r-IL-3, r-IL-5, r-эотаксин) культурах эозинофилов периферической крови применяли метод проточной лазерной двухцветной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКАТ) 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).

Оценку полученных результатов проводили методами статистического описания и проверки статистических гипотез. При анализе имеющихся выборок данных использовали гипотезу нормальности распределения (критерий Shapiro-Wilk's). Для нормально распределенных выборок вычисляли средневыборочные характеристики: среднее арифметическое (\bar{X}), среднее квадратичное

отклонение (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 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., 1999; Боровиков В.П., 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Широкая распространенность описторхоза, продолжительность жизненного цикла паразитов (более 20 лет) в организме хозяина, многообразие вызываемых ими клинических проявлений, серьезность осложнений и исходов (первичный рак печени и поджелудочной железы, аутоиммунные нарушения, цирроз печени и т.д.) определяют чрезвычайную актуальность данной проблемы, необходимость поиска путей ее решения. Особый интерес в настоящее время представляет изучение особенностей иммунного ответа, обуславливающего патологические изменения в организме, а также разработка на его основе ранних диагностических и прогностических тестов.

Установлено, что характерные особенности противопаразитарного иммунитета обусловлены прежде всего размерами патогенных объектов, против которых приходится действовать системе иммунитета [Ройт А., 1991]. Макроорганизм включает уникальные защитные механизмы, которые могут быть эффективны против многоклеточных гельминтов: высокую продукцию IgE и активацию ключевых клеток-эффекторов – эозинофилов. Известно, что повышенное содержание эозинофильных гранулоцитов является одним из первых, а иногда и единственным признаком патологического процесса, обусловленного инвазией *Opisthorchis felinus*. Согласно данным литературы, в острую фазу данного гельминтоза содержание эозинофилов достигает 20-40%, иногда - до 90% [Бронштейн А.М. и соавт., 2000]. В то же время в хроническую стадию описторхоза, по данным разных авторов, эозинофилия встречается примерно у половины заболевших - от 44 до 59% [Зубов Н.А., 1973; Пальцев А.И., Мигуськина Е.И., 1999; Озерецковская Н.Н., 2000; Бронштейн А.М., 2001]. Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, в целом согласуются с данными литературы. Нами было выявлено значительное увеличение (относительно нормы) содержания лейкоцитов эозинофильного ряда в крови у обследованных пациентов (до $45,43 \pm 8,71\%$, $p = 0,001$ – у больных

острым описторхозом; у больных хроническим описторхозом (реинвазия, суперинвазия) эозинофилия определялась в 60% случаев и регистрировалась на уровне $19,51 \pm 1,76\%$, $p=0,019$ при норме $2,18 \pm 0,06\%$).

Эозинофилы выполняют различные функции при гельминтозах и отличаются от других клеток наличием гранул, интенсивно окрашивающихся кислыми красителями, в частности эозином. Одной из основных функций эозинофилов является цитотоксическая [Paul W.E., 1989; Коровина Н.А. и соавт., 2002]. Продукты гранул этих клеток могут участвовать как в кислородзависимом лизисе, когда выделяются токсические метаболиты кислорода, так и в кислороднезависимом, который связан преимущественно с выделением большого основного белка, эозинофильного катионного протеина и пероксидазы [Джальчинова В.Б., Чистяков Г. М., 1999; Dvorak A.M., Weller P.F., 2000; Яковлева В.В. и соавт., 2003; Ешану В.С., 2004; Бережная Н.М. и соавт., 2005]. Эти механизмы могут действовать как изолировано, так и синергично, что в последнем случае обеспечивает максимальную эффективность лизиса [Медуницын Н.В., 1993; Бережная Н.М. и соавт., 2005].

В связи с вышеизложенным, в нашей лаборатории проведена оценка биоцидной активности эозинофильных гранулоцитов крови у пациентов с гельминтозом, обусловленным *O. felineus*, ассоциированным с эозинофилией. Так, в ходе проведенного цитохимического исследования у больных описторхозом, сопровождавшимся эозинофилией, регистрировалось статистически значимое повышение содержания лизосомальных катионных белков и пероксидазы в лейкоцитах эозинофильного ряда (у пациентов с острым описторхозом значения средних цитохимических коэффициентов (СЦК) содержания внутриклеточных катионных белков и пероксидазы оказались равными $2,95 \pm 0,06$ усл. ед. ($p=0,022$) и $2,99 \pm 0,03$ усл. ед. ($p=0,045$), соответственно, хроническим описторхозом - $2,78 \pm 0,05$ усл. ед. ($p=0,015$) и $2,89 \pm 0,02$ усл. ед. ($p=0,02$), соответственно, при норме $2,17 \pm 0,07$ усл. ед. и $2,43 \pm 0,07$ усл. ед., соответственно).

Очевидно, что цитотоксический эффект эозинофилов в отношении паразитических организмов, в частности *Opisthorchis felineus*, обеспечивается целым рядом механизмов, одним из которых является кислородзависимый киллинг гельминтов. Под этим понимается каскад реакций, в результате которых образуются активные формы кислорода, перекись водорода и его производные. Оценка системы кислородзависимой бактерицидности эозинофильных гранулоцитов периферической крови у пациентов с описторхозом, ассоциированным с высокой эозинофилией периферической крови, позволила констатировать достоверное увеличение, по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров, спонтанной и стимулированной пирогедалом поглотительной способности эозинофилов (значения базального и индуцированного пирогедалом НСТ-теста превышали аналогичные показатели контроля в среднем в 2,1 ($p=0,012$ и $p=0,041$) раза у пациентов с острым гельминтозом и 2,5 раза ($p=0,04$ и $p=0,034$) у больных хроническим описторхозом, соответственно). Кроме того, у пациентов с хронической

формой данного гельминтоза, ассоциированного с эозинофилией, абсолютное число активных эозинофилов в НСТ-тесте (спонтанном и стимулированном пирогеналом) оказалось достоверно ниже аналогичных показателей у больных острым описторхозом (на 73 и 78%, $p=0,027$ и $p=0,011$, соответственно).

Другим фактором, обуславливающим значительное усиление бактерицидности эозинофилов, может быть повышение их способности к дегрануляции и цитолизу [Анаев Э.Х. и соавт., 1997; Ружицкая Е.А. и соавт., 2000]. Это положение подтверждается результатами нашего исследования, выявившего значительное повышение (относительно нормы) содержания эозинофилов с нарушенными морфологическими свойствами (без антигенной стимуляции: у пациентов с острым описторхозом - $7,79\pm 2,04\%$ ($p=0,001$) и $0,210\pm 0,010$ Г/л ($p=0,022$), соответственно, с хроническим описторхозом - $6,37\pm 0,83\%$ ($p=0,031$) и $0,070\pm 0,000$ Г/л ($p=0,008$) при норме - $2,54\pm 0,05\%$ и $0,002\pm 0,000$ Г/л). При добавлении в пробы *in vitro* антигена *O.felineus* содержание абсолютного и процентного числа эозинофилов периферической крови с измененными морфологическими свойствами также оказалось выше средних значений этих параметров в контрольной группе (у пациентов с острым описторхозом - $28,40\pm 1,19\%$ ($p=0,023$) и $0,830\pm 0,020$ Г/л ($p=0,001$), хроническим описторхозом - $19,05\pm 1,13\%$ ($p=0,049$) и $0,270\pm 0,030$ Г/л ($p=0,043$) при норме - $5,02\pm 0,07\%$ и $0,010\pm 0,001$ Г/л). Следует отметить, что изменения морфологии лейкоцитов эозинофильного ряда носили преимущественно характер цитолиза: разбухшие клетки в 2 и более раз превышали размеры нейтрофилов, оболочка была разорвана, рядом с клетками визуализировались гранулы. Наряду с этим была зарегистрирована повышенная вакуолизация ядра и цитоплазмы эозинофильных гранулоцитов.

Резюмируя представленные выше результаты, следует заключить, что напряжение кислороднезависимых и кислородзависимых процессов киллинга эозинофилов, обнаруженное нами при остром и хроническом описторхозе, ассоциированных с эозинофилией, обуславливает формирование их высокого цитотоксического потенциала. Следует обратить внимание на тот факт, что повышенная активация эозинофильных гранулоцитов сопровождается выделением биологически активных веществ, токсичных не только в отношении личинок гельминтов, но и клеток макроорганизма, что может приводить к повреждению тканевых структур.

Говоря об эозинофилах, как об агрессивных эффекторных клетках воспаления, нельзя забывать о том, что современные представления о роли эозинофильных гранулоцитов сводятся к их включению в регуляцию иммунологического и тканевого гомеостаза. В свете нового понимания физиологического значения эозинофилов особый интерес, на наш взгляд, представляют данные об их способности взаимодействовать с иммунокомпетентными клетками макроорганизма. В связи с этим для нас особую актуальность представляло изучение роли лейкоцитов эозинофильного ряда в иммунопатогенезе описторхоза с позиции цитокинопосредованной кооперации эффекторных клеток.

Многочисленные исследования иммунного ответа, вызванного паразитированием гельминтов в организме хозяина, показали, что в иммунологическую реакцию вовлекаются основные популяции лимфоцитов иммунной системы (Т-лимфоциты, В-лимфоциты, нулевые клетки). Изучение иммунного статуса организма хозяина имеет важное значение в определении прогноза заболевания и разработке иммунокорректирующей терапии [Кальгина Г.А. и соавт., 2002].

Проведенный нами анализ субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с описторхозом позволил выявить значительный иммунный дисбаланс, выражающийся в индукции В-звена и, напротив, депрессии Т-популяций лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$) со снижением иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$). При этом выявленные изменения имели одинаковую направленность, но разную степень выраженности у пациентов с острым и хроническим описторхозом (рис.2). Однако при хроническом течении данного гельминтоза отмечалось подавление преимущественно клеточного звена иммунореактивности с развитием признаков иммуносупрессии.

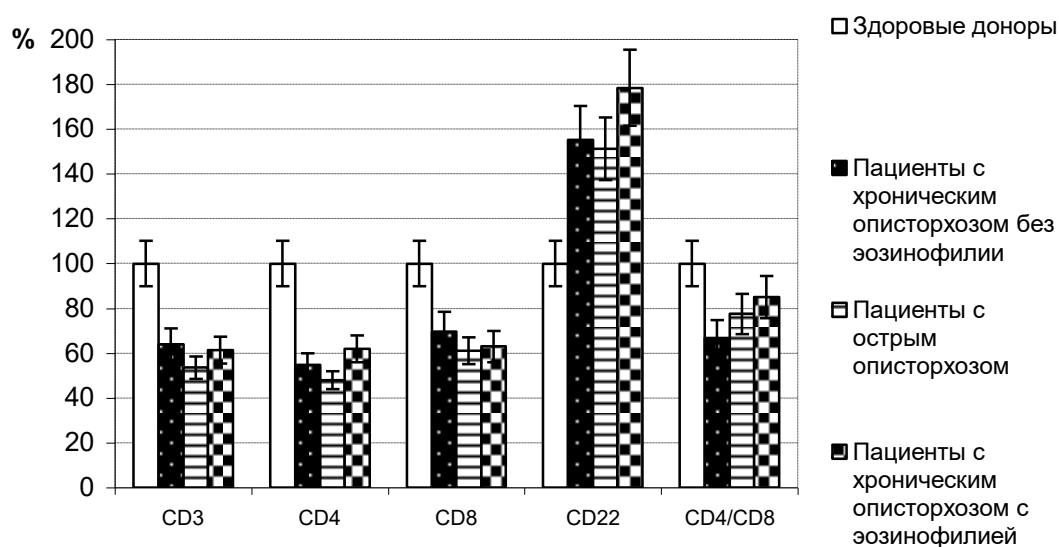


Рис.2 Содержание субпопуляций лимфоцитов у пациентов с описторхозом

Учитывая вышеизложенное, можно говорить о нарушении популяционной и субпопуляционной структур периферических лимфоцитов у больных описторхозом. Так, депрессия Т-популяции лимфоцитов иммунной системы, по-видимому, обусловлена большим количеством описторхозного антигена, который блокирует рецепторы Т-лимфоцитов. Активация В-лимфоцитов свидетельствует о напряженном их функционировании, что можно расценивать как компенсаторную реакцию на описторхозный материал.

Известно, что важнейшую роль в регуляции иммунного ответа играют цитокины, так как именно баланс этих медиаторов определяет форму последующего специфического ответа – преимущественно клеточного или гуморального [Ярилин А.А., 1999]. Цитокины представляют собой белковые или полипептидные продукты активированных клеток иммунной системы,

которые являются медиаторами межклеточных коммуникаций не только при иммунном ответе, но и гемопоэзе, развитии воспаления, эффекторами некоторых реакций иммунитета, служат связующим звеном между иммунной и другими системами организма [Кадагидзе З.Г., 2003]. Вся цитокиновая система представляет собой сетевую структуру, в которой постоянно происходит кооперация клеток. Поэтому основу патологических проявлений при многих болезнях составляет дисрегуляция цитокиновой сети. По мнению многих исследователей, именно нарушение продукции медиаторов Th1/Th2 клетками может иметь важное значение в реализации иммунопатогенеза гельминтозов [Беклемишев Н.Д., 1998; Озерецковская Н.Н., 2000]. Известно, что характерные признаки развития иммунного ответа при заражении *Opisthorchis felinus* – высокий уровень IgE и эозинофилия – зависят от действия цитокинов, секретируемых преимущественно Th2-лимфоцитами [Newcom S.R. et al., 1992; Медуницын Н.В., 1993; Бережная Н.М. и соавт., 2000, 2005].

Одним из основных цитокинов, продуцируемых Th2-лимфоцитами и играющих ключевую роль в инициации и реализации гуморального иммунного ответа, является IL-4, функциональная активность которого определяется способностью усиливать дифференцировку Th-0-лимфоцитов в Th2 типа (рис.3) [Кадагидзе З.Г., 2003]. Известно, что IL-4 – ключевой цитокин противопаразитарного иммунного ответа – «запускает» у T- и B-лимфоцитов гены, контролируемые синтез IgE и IgG [Намазова Л.С. и соавт., 2000].

Согласно данным, полученным в ходе настоящего исследования, у всех обследованных больных описторхозом независимо от наличия эозинофилии крови и фазы клинического процесса отмечалось достоверное увеличение (относительно нормы) уровня спонтанной и ФГА-стимулированной продукции IL-4 (у больных острым описторхозом медианные значения базальной и индуцированной продукции данного цитокина составляли – 43,81 (39,10-40,61) пг/мл, $p=0,001$ и 52,10 (51,03-55,08) пг/мл, $p=0,034$, соответственно, у лиц с хроническим описторхозом с эозинофилией – 38,21 (31,81-43,90) пг/мл, $p=0,043$ и 55,46 (39,67-62,36) пг/мл, $p=0,038$, соответственно, без эозинофилии – 39,00 (31,01-46,57) пг/мл, $p=0,032$ и 60,40 (54,30-64,35) пг/мл, $p=0,041$, соответственно, при норме – 26,40 (25,20-27,60) пг/мл и 42,00 (37,00-49,40) пг/мл).

Другими ключевыми цитокинами, регулирующими функциональную активность лейкоцитов эозинофильного ряда, являются IL-3, IL-5 и GM-CSF (рис.3) [Kubin R., 1991; Gulbenkian A.R. et al., 1992; Sturm D. et al., 1995; Kay A.V. et al., 1997; Kotsimbos A.T., Hamid Q., 1997; Намазова Л.С. и соавт., 2000].

В ходе проведенного нами исследования у больных описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, было зарегистрировано значимое увеличение уровней конституциональной и ФГА-индуцированной продукции IL-5 и GM-CSF, а также конституциональной секреции IL-3 мононуклеарными клетками периферической крови по сравнению с аналогичными значениями у здоровых доноров и у пациентов с хроническим описторхозом без эозинофилии (у больных острым описторхозом медианные значения базальной и индуцибельной продукции IL-5 составляли 183,0 (160,0-204,2) пг/мл, $p=0,001$ и

318,3 (217,7-465,0) пг/мл, $p=0,029$, соответственно, хроническим описторхозом с эозинофилией - 168,0 (151,2-199,0) пг/мл, $p=0,027$ и 227,0 (208,1-347,2) пг/мл, $p=0,028$, у пациентов с хроническим описторхозом без эозинофилии - 105,2 (89,0-117,4) пг/мл и 155,3 (141,0-168,0) пг/мл, соответственно, у здоровых доноров - 98,0 (90,0-105,0) пг/мл и 164,0 (158,0-190,0) пг/мл, соответственно; содержание GM-CSF у лиц в острую фазу данного гельминтоза - 128,00 (96,37-253,5) пг/мл, $p<0,001$ и 154,0 (72,12-289,3) пг/мл, $p=0,001$, соответственно, в хроническую фазу, сопряженную с эозинофилией - 21,65 (11,33-61,60) пг/мл, $p=0,045$ и 47,61 (41,90-55,01) пг/мл, $p=0,025$, без эозинофилии - 8,45 (5,48-14,21) пг/мл и 13,27 (12,01-21,27) пг/мл, у здоровых доноров - 6,23 (6,10-7,56) пг/мл и 10,08 (9,42-13,02) пг/мл; уровень IL-3 у пациентов с острой стадией описторхоза - 27,83 (16,03-32,11) пг/мл, $p=0,033$, у здоровых лиц - 13,72 (12,21-14,02) пг/мл и у больных хроническим описторхозом без эозинофилии - 19,20 (15,00-23,49) пг/мл). При хроническом течении данного гельминтоза, осложнившимся развитием эозинофилии, способность мононуклеаров крови секретировать IL-3 соответствовала норме ($p=0,199$; $p=0,841$). Наряду с этим, оценка резервных возможностей мононуклеарных лейкоцитов синтезировать эозинофилспецифичные цитокины (IL-3, IL-4 IL-5 и GM-CSF) позволила выявить достоверное снижение индекса стимуляции продукции исследованных медиаторов у больных описторхозом. Данное обстоятельство может свидетельствовать, на наш взгляд, об истощении потенциала мононуклеарных клеток продуцировать иммуоцитокينات в условиях стимуляции их внутриклеточного метаболизма.

Небезынтересно, что у лиц, страдающих острым гельминтозом, обусловленным инвазией *O.felineus*, нами было обнаружено наличие позитивных связей между уровнем продукции IL-3, IL-5 и содержанием эозинофилов периферической крови ($r=0,560$, $p<0,05$; $r=0,735$, $p<0,05$, соответственно), что свидетельствует о значительной роли данных медиаторов в формировании эозинофилии в острую фазу описторхоза.

Известно, что процесс рекрутирования эозинофилов наряду с IL-5 регулируется эотаксином (рис.3). Возможно, формирование выраженной эозинофилии при описторхозе может быть связано с действием данного хемокина, специфично действующего в отношении лейкоцитов эозинофильного ряда.

При исследовании уровня эотаксина с помощью иммуноферментного анализа нами было зарегистрировано значительное его повышение (относительно показателей контроля) в сыворотке крови (у лиц, страдающих острым описторхозом до 74,84 (41,91-93,29) пг/мл, $p=0,003$ и хроническим описторхозом, сопряженным с формированием эозинофилии крови - до 70,98 (60,53-79,08) пг/мл, $p=0,045$, так и без таковой - до 72,00 (51,19-91,21) пг/мл, $p=0,021$, при норме - 58,95 (50,11-66,95) пг/мл). У пациентов с острой стадией данного гельминтоза обращало на себя внимание наличие корреляционных связей между концентрацией эотаксина и относительным содержанием эозинофилов крови ($r=0,790$, $p<0,05$), что свидетельствует о существенной роли данного хемокина в механизмах формирования эозинофилии.

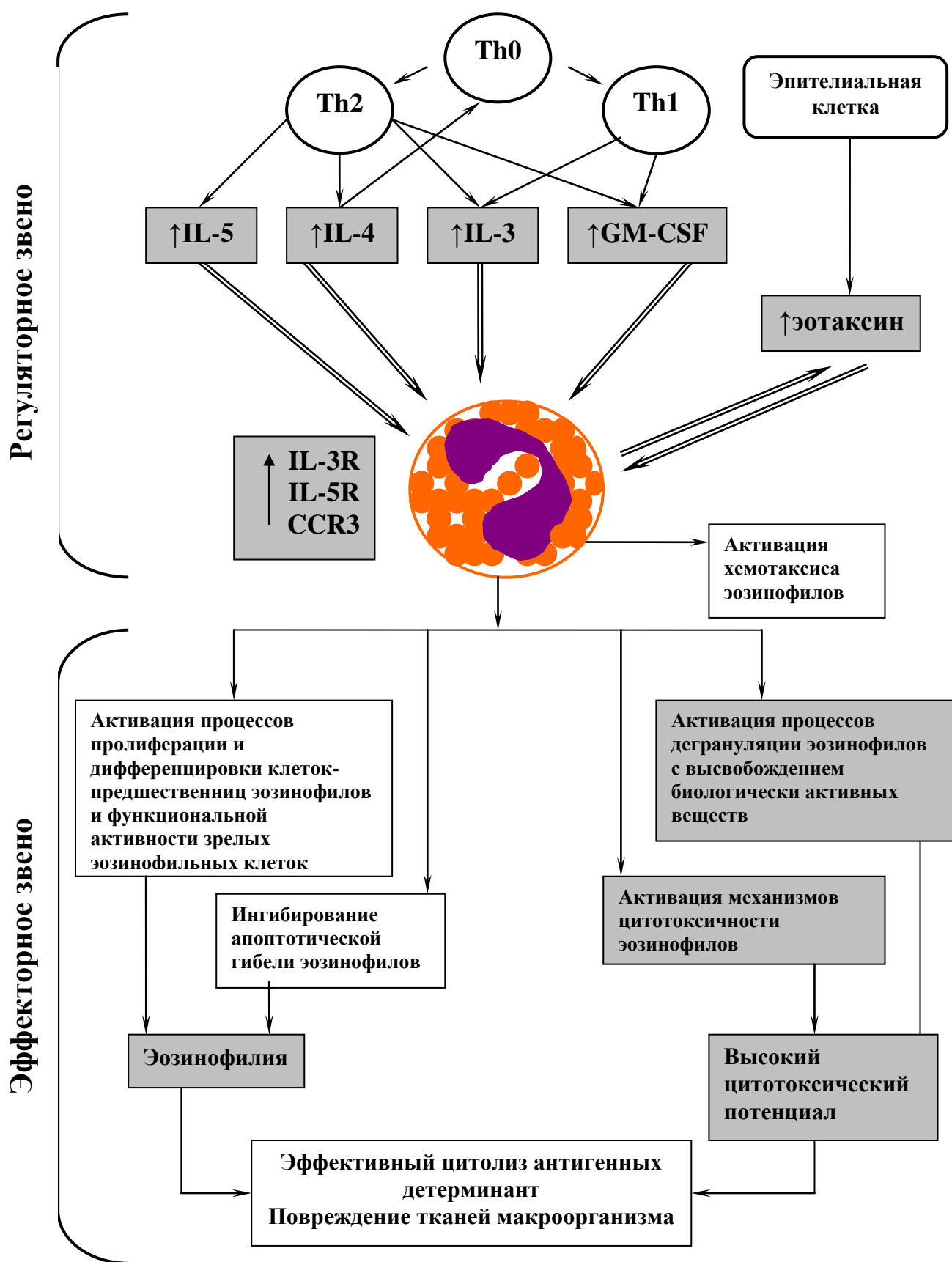


Рис.3 Роль цитокинов (IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, эотаксина) в регуляции эозинофильных гранулоцитов [по данным И.Д. Беклемишева, 1998; А.А. Тотоляна, 2001; А.И. Воробьева, 2002 и результатам собственных исследований (выделено серым)]

Таким образом, проведенное нами исследование цитокинпродуцирующей способности мононуклеаров крови свидетельствует о том, что острая и хроническая стадии описторхоза сопровождаются дисбалансом продукции цитокинов, что имеет большое значение в иммунопатогенезе гельминтозов и развитии эозинофилии. Обнаруженное нами увеличение секреции ИЛ-4, ИЛ-5 и ИЛ-3 мононуклеарами крови может быть обусловлено способностью антигенов описторхисов определенным образом стимулировать продукцию данных медиаторов Th-2 клонами клеток [Озерецковская Н.Н., 1997, 2000]. Однако на сегодняшний день существуют сведения о неоднозначной роли Th-1 и Th-2 клонов лимфоцитов в защите от инвазии при различных гельминтозах. По данным одних авторов, преобладание Th-2 популяции определяет развитие тяжелой, прогрессирующей болезни, другие исследователи полагают, что избыточная продукция Th-2-цитокинов в синергизме с высокой эозинофилией периферической крови обуславливает освобождение организма от зрелых паразитов и прекращение лавропродукции [Ohmiya N. et al., 1997; Озерецковская Н.Н., 2000; Токмалаев А.К., 2001].

Общеизвестно, что ответ клеток иммунной системы на действие цитокинов возможен лишь при условии экспрессии на поверхности этих клеток соответствующих рецепторов. Известно, что мембрана эозинофилов несет на своей поверхности разнообразные антигенные структуры, среди которых выделяют CD13 и CD33 - общие маркеры, свойственные гранулоцитарному росту; молекулы, определяющие способность к адгезии и активации, в частности CD9, CD18, CD25, CD28L, CD62L, CD37, CD69; рецепторы для активированных компонентов комплемента (C3b, C3d, C4); Fc-рецепторы для молекул IgE и IgG; рецепторы для гистамина, простагландина D₂, хемокинов семейства CC и др. [Carpon M. et al., 1984; Seminario M.C., Vochner B.S., 1997; Matsumoto K. et al., 1998; Джальчинова В.Б., Чистяков Г.М., 1999; Адаскевич В.П., Зыкова О.С., 2000; Tachimoto H., Vochner B.S., 2000; Воробьев А.И., 2002]. Несомненный интерес для нашего исследования представляют рецепторы для эозинофилспецифичных цитокинов. С использованием метода лазерной проточной цитофлуориметрии нами было проведено исследование *in vitro* презентации рецепторов к ИЛ-5, ИЛ-3 и эотаксину в интактной культуре эозинофилов, полученных у больных описторхозом, ассоциированных с эозинофилией. В ходе этого исследования у лиц с острым описторхозом было зафиксировано достоверное увеличение абсолютного и относительного количества ИЛ-5R-, ИЛ-3R- и CCR3-позитивных клеток по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (рис.4). При хроническом гельминтозе, обусловленном инвазией *O.felineus* (реинвазия, суперинвазия), также было выявлено повышение абсолютного и относительного числа эозинофилов, презентующих ИЛ-5R, процентное содержание (в 4,5 раз) ИЛ-3R-несущих клеток, тогда как число эозинофильных гранулоцитов, презентующих CCR3, варьировало в пределах нормальных значений. Таким образом, на первый взгляд можно заключить, что выявленная нами повышенная презентация исследуемых рецепторов на эозинофилах при описторхозе может быть результатом избыточной продукции соответствующих цитокинов

иммунокомпетентными клетками [Токмалаев А. К., 2001]. Это предположение подтверждается положительной корреляционной зависимостью между уровнем 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 острым описторхозом (соответственно $r=0,640$, $p<0,050$; $r=0,530$, $p<0,05$; $r=0,541$, $p<0,05$).

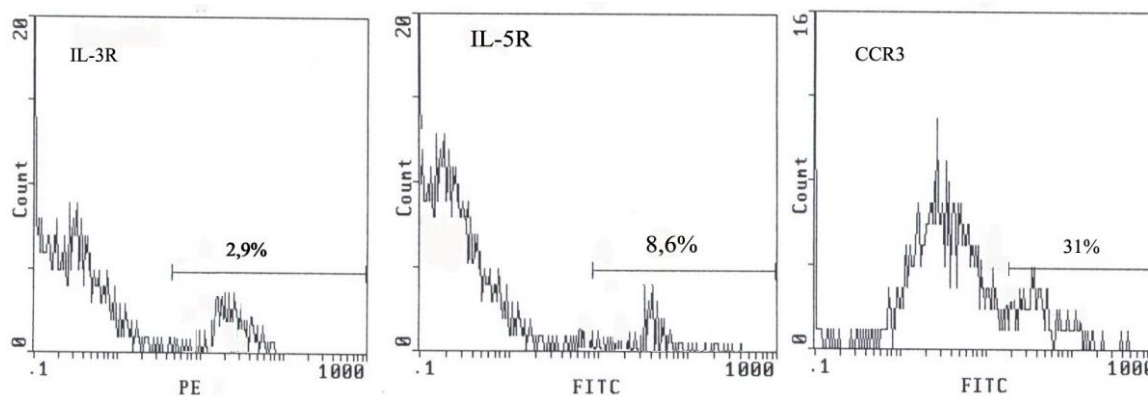


Рис.4 Одномерная гистограмма, отражающая количество эозинофилов (%) периферической крови у пациента В., 34 года с острым описторхозом, несущих рецепторы к цитокинам (IL-3, IL-5, эотаксину) в интактной культуре (по данным лазерного проточно-цитометрического анализа)

Однако в процессе настоящего исследования мы проводили инкубацию эозинофилов с рекомбинантными цитокинами *in vitro*. Посылком к этому явился известный факт о том, что после активации одноименными лимфокинами или антигенными детерминантами усиливается способность клеток презентировать мембранноассоциированные цитокиновые рецепторы. Так, при добавлении в культуру клеток, полученных у пациентов с описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, r-IL-5, r-IL-3 и r-эотаксина вне зависимости от фазы течения гельминтоза отмечалось повышение относительного и абсолютного содержания IL-5R- и CCR3-несущих эозинофилов и абсолютного числа клеток эозинофильного ряда, несущих IL-3R по сравнению с аналогичными показателями в контрольной группе.

При этом относительное число эозинофильных гранулоцитов, презентующих CCR3, при хроническом описторхозе, хотя и было несколько повышенным, но достоверной разницы средних значений данного показателя у этих больных и здоровых лиц зафиксировано не было. Вместе с тем соотношение показателей, характеризующих стимулированную и спонтанную презентацию рецепторов к цитокинам, было продемонстрировано с использованием индекса стимуляции. Значения индексов стимуляции презентации IL-5R и IL-3R у больных описторхозом, ассоциированным с эозинофилией, оказались достоверно ниже аналогичных показателей в норме. Данное обстоятельство свидетельствует о снижении резервной способности эозинофильных гранулоцитов презентировать рецепторы к IL-5 и IL-3 (рис.5).

Таким образом, при описторхозе имеет место дисбаланс рецепторного аппарата эозинофилов, что может обуславливать нарушение в системе

кооперативного взаимодействия клеток и являться механизмом, лежащим в основе пролонгированного пребывания эозинофильных гранулоцитов в крови. У пациентов с острой стадией данного паразитоза, это предположение подтверждается наличием позитивной корреляции между относительным количеством клеток, презентующих рецепторы к IL-5 и эотаксину, процентным содержанием эозинофильных гранулоцитов периферической крови ($r=0,780$, $p<0,05$ и $r=0,921$, $p<0,05$, соответственно).

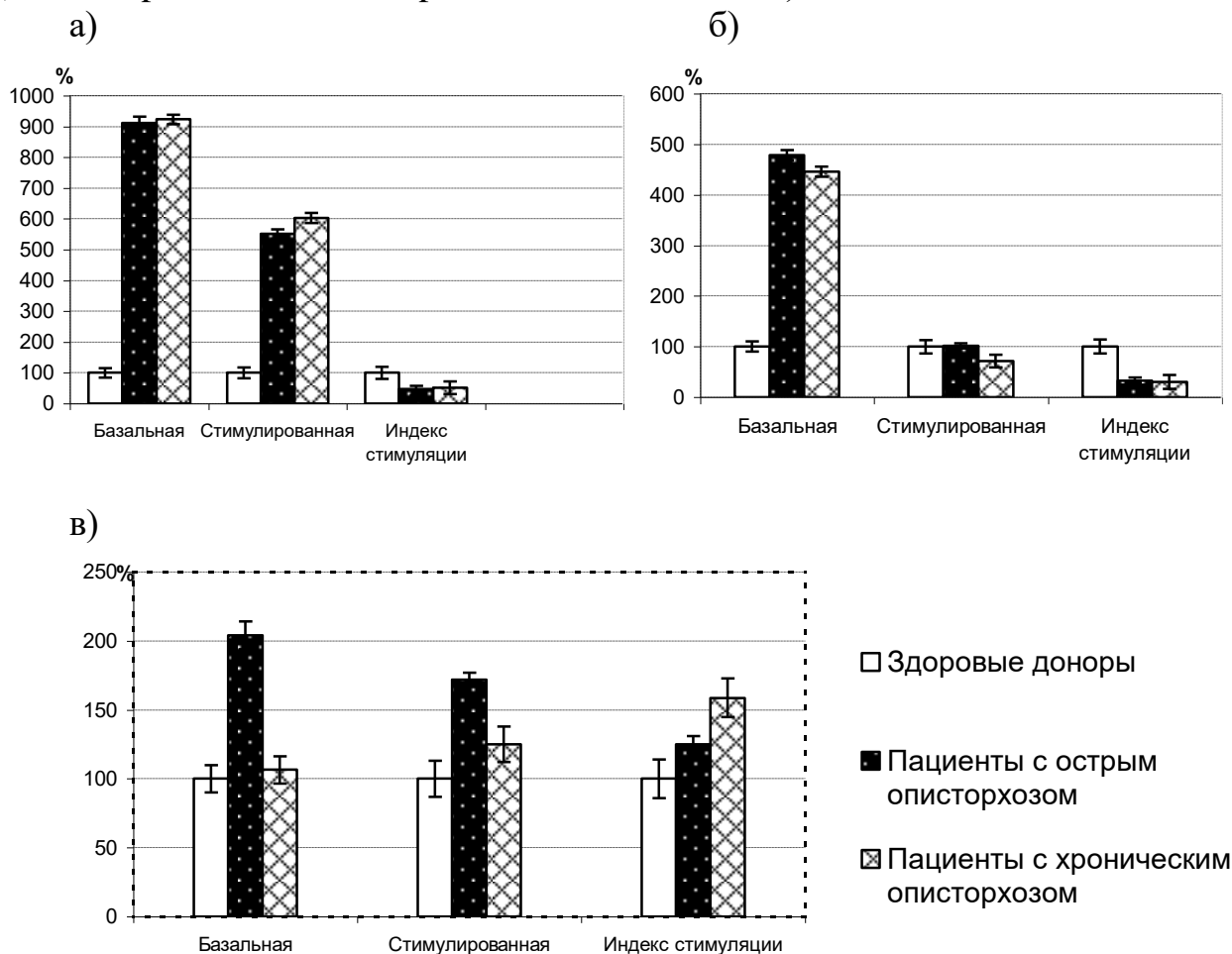


Рис.5 Содержание IL-5R- (а), IL-3R- (б) и CCR3-позитивных клеток (в) в культуре эозинофилов, полученных у пациентов с гельминтозом, вызванным *O.felineus*, сопровождающихся эозинофилией

Подводя итог, следует отметить, что изменения реагирования системы иммунитета при описторхозе, сопровождающемся гиперэозинофилией, характеризуются супрессией иммунного ответа (количественный дефицит Т-клеточного звена иммунной системы), дисбалансом продукции иммунорегуляторных цитокинов (IL-5, IL-3, IL-4 и GM-CSF) мононуклеарами и уровня эотаксина в периферической крови. В то же время у всех больных данным гельминтозом, ассоциированным с эозинофилией, было выявлено повышенное количество эозинофилов, несущих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину (рис.6).

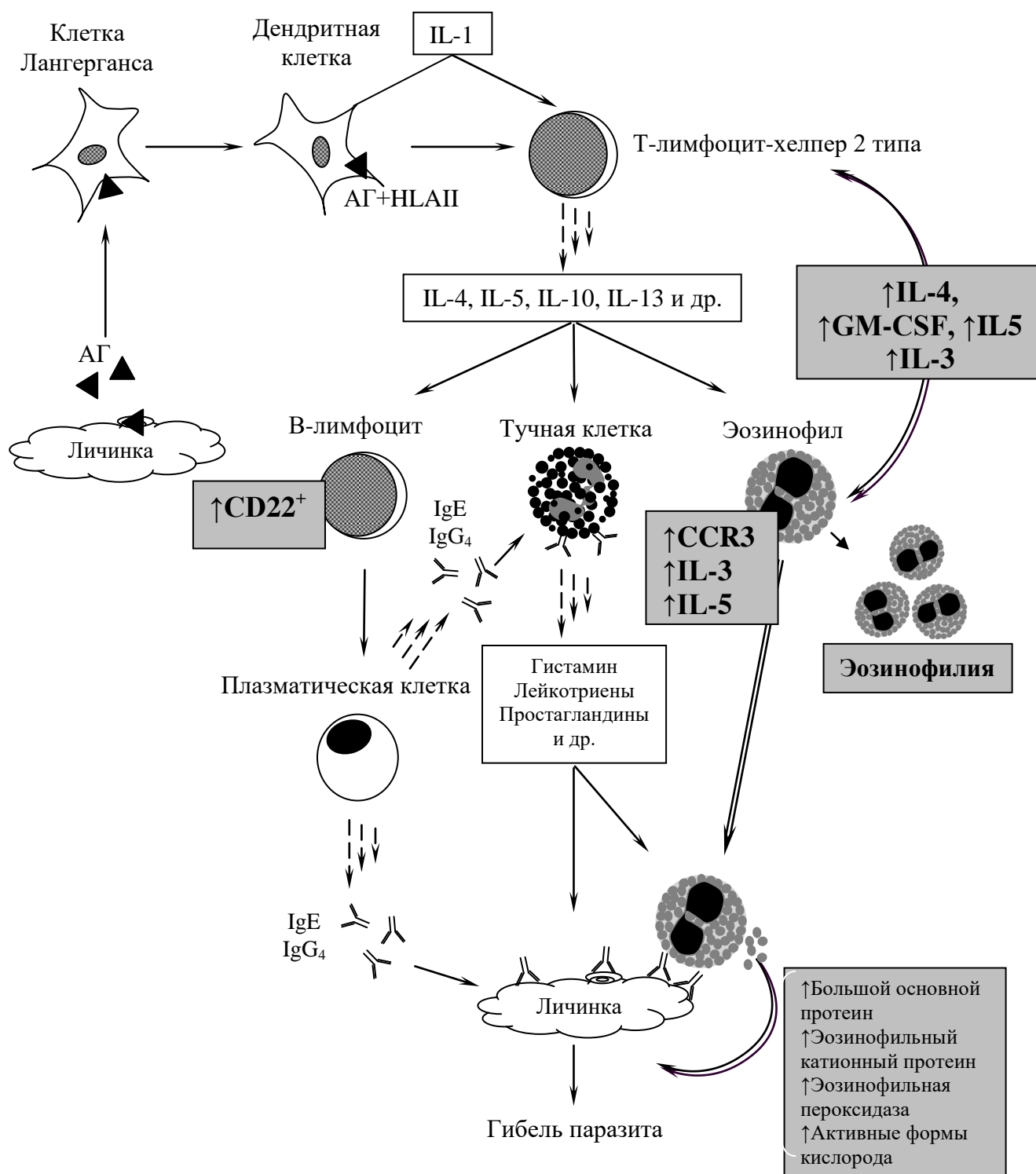


Рис.6 Роль эозинофилов в иммунопатогенезе описторхоза [по данным И.Д. Беклемишева, 1998; А.И. Воробьева, 2002; Н.М. Бережной и соавт., 2005 и результатам собственных исследований (выделено серым)]

При дополнительном воздействии на эозинофилы *in vitro* рекомбинантных форм IL-3, IL-5 и эотаксина установлено снижение функционального потенциала последних в отношении презентации IL-3R и IL-5R при неизменной способности эозинофилов презентировать рецептор к эотаксину (рис.6). Кроме этого, у всех лиц независимо от стадии течения гельминтоза, обусловленного инвазией *O.felineus*, ассоциированного с эозинофилией, была выявлена интенсификация кислороднезависимых и кислородзависимых процессов киллинга, что обуславливает формирование высокого микробицидного потенциала эозинофильных гранулоцитов, действие которого может быть направлено не только в отношении инородных субстанций, но и тканей макроорганизма. Данное обстоятельство, по-видимому, определяет отрицательное влияние длительной эозинофилии крови на течение патологического процесса.

Полученные фундаментальные данные представляют значительный интерес для понимания механизмов развития эозинофилии крови при описторхозе с позиции межклеточных взаимодействий. Анализ механизмов межклеточной кооперации значим не только с точки зрения вскрытия природы изучаемого феномена, но и для понимания патогенеза иммунологических нарушений при данном паразитозе, сопровождающемся высокой эозинофилией крови. Результаты данного исследования могут составлять основу для создания патогенетически обоснованной иммунокоррекции.

ВЫВОДЫ

1. Высокий микробицидный потенциал эозинофильных клеток крови при больших эозинофилиях у больных описторхозом обусловлен напряжением кислороднезависимых процессов киллинга и увеличением их фагоцитарной активности.
2. Морфологические особенности эозинофильных лейкоцитов крови (интактные клетки и в условиях инкубации *in vitro* с очищенными фиксированными иммунодоминантными фракциями белков *O.felineus*) у больных описторхозом, сопряженным с эозинофилией, характеризуются дегрануляцией, повышенной вакуолизацией ядра и цитоплазмы.
3. При гельминтозе, обусловленном инвазией *Opisthorchis felineus*, сопровождающемся эозинофилией, развивается значительный иммунный дисбаланс, выражающийся индукцией В-звена при депрессии Т-популяций лимфоцитов ($CD4^+$, $CD8^+$), уменьшением иммунорегуляторного индекса ($CD4^+/CD8^+$).
4. Развитие описторхоза, ассоциированного с эозинофилией, сопровождается увеличением продукции мононуклеарными лейкоцитами цитокинов, регулирующих процессы пролиферации, дифференцировки и активации эозинофильных клеток (IL-3, IL-4, IL-5 и GM-CSF), и повышением уровня эотаксина в сыворотке крови, наиболее выраженным в острую фазу гельминтоза.

5. У больных с острой и хронической формой описторхоза повышено количество эозинофилов крови, несущих рецепторы к IL-3, IL-5 и эотаксину.
6. При дополнительной стимуляции *in vitro* эозинофильных клеток, полученных у больных описторхозом с гиперэозинофилией, рекомбинантными формами IL-3, IL-5 и эотаксина установлен факт снижения резервной способности эозинофилов презентировать IL-3R и IL-5R при неизменном количестве эозинофилов, несущих рецептор к эотаксину.
7. Дисбаланс продукции моноклеарными лейкоцитами IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF и рецепторного аппарата лейкоцитов эозинофильного ряда (IL-3R, IL-5R и CCR3) обуславливает нарушение в системе кооперативного взаимодействия эффекторных клеток крови и лежит в основе пролонгированного пребывания эозинофильных гранулоцитов в крови при описторхозе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Изменение продукции IL-4 иммунокомпетентными клетками при хроническом описторхозе / Л.С. Литвинова, Ю.В. Колобовникова, Е.С. Григорьева, Е.В. Суворова, Н.В. Рязанцева, А.П. Зима, О.Б. Жукова // Тезисы докладов I Съезда физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека», Сочи, 2005. – С. 118 - 119.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

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

8. Изменение продукции 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.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

НСТ - нитросиний тетразолий

СЦК - средний цитохимический коэффициент

ФГА - фитогемагглютинин

CD – поверхностный кластер дифференцировки

GM-CSF - гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

Ig - иммуноглобулин

IL – интерлейкин

Th – Т-хелперы

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.