

УДК 616.24-002.5-097.3:616.155.348/.35

ИЗМЕНЕНИЕ ЭФФЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Чумакова С.П., Новицкий В.В.

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Томск, e-mail: office@ssmu.ru

Эозинофильные гранулоциты – агрессивные эффекторные клетки воспаления, обладающие широким арсеналом цитотоксических белков и фагоцитарной активностью. С привлечением современных иммунологических методов исследования проведена оценка цитотоксических свойств, фагоцитарной и адгезионной способности эозинофилов периферической крови при туберкулезе легких. В ходе проведенного исследования у пациентов с туберкулезной инфекцией установлено усиление адгезивных свойств и фагоцитарной функции эозинофилов в сочетании с понижением активности эозинофильной пероксидазы. Причем у больных туберкулезом легких с эозинофилией содержание CD18-презентирующих эозинофилов и активность эозинофильной пероксидазы оказались выше, чем у больных без эозинофилии. Туберкулез легких (особенно в сочетании с эозинофильной реакцией крови) характеризуется высокой активностью эозинофильных гранулоцитов в отношении дальнейшей аккумуляции в очаге гранулематозного воспаления, способных реализовывать свой цитотоксический потенциал как в отношении *Micobacterium tuberculosis*, так и «здоровой» ткани легкого.

Ключевые слова: туберкулез легких, эозинофилы, молекулы адгезии, пероксидаза, фагоцитоз

CHANGE OF EFFECTOR PROPERTIES OF EOSINOPHIL GRANULOCYTES IN PULMONARY TUBERCULOSIS

Kolobovnikova Y.V., Urazova O.I., Chumakova S.P., Novitskiy V.V.

State budget educational institution of higher professional education «Siberian State Medical University» of the Ministry of Health Care and Social Development of the Russian Federation, Tomsk, e-mail: office@ssmu.ru

Eosinophil granulocytes are aggressive inflammatory effector cells which have a wide range of cytotoxic proteins as well as phagocytic activity. With the attraction of modern immunological research methods, we assessed the cytotoxic properties as well as the phagocytic and adhesive abilities of peripheral blood eosinophils in pulmonary tuberculosis. In the course of the conducted research, we established an increase in the adhesive properties and the phagocytic function of eosinophils in combination with a decrease in the activity of eosinophil peroxidase in TB patients. Moreover, in patients with pulmonary tuberculosis with eosinophilia the content of CD18-presenting eosinophils and the activity of eosinophil peroxidase turned out to be higher than in patients without eosinophilia. Pulmonary tuberculosis (especially in conjunction with eosinophilic blood reaction) is characterized by high activity of eosinophil granulocytes – in relation to their further accumulation in the focus of granulomatous inflammation – which can realize their cytotoxic potential with respect to both *Micobacterium tuberculosis* and «healthy» lung tissue.

Keywords: pulmonary tuberculosis, eosinophils, adhesion molecules, peroxidase, phagocytosis

Несмотря на то, что эозинофилия не является характерным симптомом бактериальных инфекций, туберкулез легких нередко сопровождается возникновением данной гематологической реакции. Доказано также присутствие эозинофильных лейкоцитов в составе гранулемы, образующейся в легочной ткани при внедрении *Micobacterium tuberculosis*.

Эозинофилы – агрессивные эффекторные клетки – при активации экспрессируют на своей поверхности разнообразные рецепторные структуры, опосредующие их вовлечение и миграцию в очаг воспаления, секретируют широкий спектр цитотоксических протеинов: главный основной протеин, эозинофильный катионный протеин, эозинофильный нейротоксин и эозинофильную пероксидазу [8]. Последняя при участии перекиси водорода, галогенидов и псевдогалогенидов формирует потенциальную ци-

тотоксическую систему, эффективную против бактерий [2]. В современной литературе представлены также данные о фагоцитарных свойствах эозинофильных клеток. Несмотря на меньшую фагоцитарную активность, чем у макрофагов и нейтрофилов, эозинофилы способны осуществлять эффективное поглощение вирулентных и авирулентных штаммов микобактерий [5, 8].

Современные знания о функциональных возможностях эозинофильных гранулоцитов позволяют рассматривать эти малоизученные (в контексте бактериальной инфекции) клетки в качестве полноценных участников эффекторных механизмов антибактериальной защиты.

В связи с этим, **целью** настоящего исследования явилась оценка цитотоксических свойств, фагоцитарной и адгезионной способности эозинофильных гранулоцитов при туберкулезе легких.

Материал и методы исследования

Под наблюдением находилось 35 больных с впервые выявленным распространенным деструктивным туберкулезом легких (инфильтративный, диссеминированный) в возрасте от 18 до 55 лет. Диагноз устанавливали на основании клинической картины заболевания, рентгенологического исследования органов грудной клетки, данных микроскопического и бактериологического анализа мокроты. В зависимости от абсолютного и относительного количества эозинофилов в периферической крови были сформированы две основные группы исследования: первую группу составили 16 пациентов с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией (абсолютное число эозинофилов соответствовало $(0,85 \pm 0,01)$ Г/л, относительное – $(8,00 \pm 0,46)$ %), во вторую группу вошли 19 больных туберкулезом легких без эозинофилии (абсолютное число эозинофилов – $(0,29 \pm 0,01)$ Г/л, относительное – $(3,00 \pm 0,30)$ %).

Группу сравнения (контроль) составили 14 здоровых доноров (абсолютное число эозинофилов – $(0,07 \pm 0,01)$ Г/л, относительное – $(1,23 \pm 0,30)$ %), сопоставимых по полу и возрасту.

Все обследованные лица отрицали наличие в анамнезе аллергических заболеваний, отягощенной наследственности, лекарственной и пищевой аллергии. При проведении иммуноферментного анализа у всех обследованных лиц диагностически значимых титров антител (иммуноглобулинов класса G) к антигенам описторхисов, трихинелл, токсокар и эхинококков в сыворотке крови не обнаруживалось.

Все исследования у больных туберкулезом легких проводили до начала специфической противотуберкулезной терапии.

Материалом исследования служила венозная кровь. Все исследования проводили на эозинофильных гранулоцитах, предварительно выделенных на прерывистом градиенте плотности Percoll ($\rho = 1,133$ г/л) («Sigma Life Science», США). Для определения уровня экспрессии CD9 и CD18 на мембране эозинофильных гранулоцитов применяли метод лазерной проточной цитометрии с использованием меченых моноклональных антител к соответствующим рецепторным структурам. Процедуру окрашивания поверхностных маркеров проводили согласно протоколу фирмы-производителя («Becton Dickinson», США). Для оценки фагоцитарной способности эозинофилов пробоподготовку осуществляли согласно инструкции, прилагаемой производителем тест-системы PHAGOTEST («Glycotope Biotechnology GmbH», Германия). Измерения производили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргоновым лазером длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD: CellQuest for Mac OS® X. Активность пероксидазы в лизате эозинофильных гранулоцитов оценивали по методу, предложенному E. Sato в модификации D. Quaglino. Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Привлечение эозинофилов в очаг гранулематозного воспаления осуществляется при участии хемокинов, экспрессии

соответствующих рецепторов и молекул адгезии на мембране клеток. Посредством L-селектина и сиалил- Le^x осуществляется первоначальное прикрепление и «роллинг» циркулирующих эозинофилов *in vivo* [9]. Прочная адгезия и трансмиграция эозинофилов через сосудистый эндотелий обеспечивается молекулами адгезии семейства β_2 - (CD11a/CD18 (Mac-1) и CD11b/CD18 (LFA-1)) и β_1 - интегринов (VLA-4), а также CD9 (семейство тетраспанинов). Последние имеют наибольшее значение в агрегации эозинофильных гранулоцитов и их адгезии к фибронектину [4]. По данным литературы, при воспалении происходит значительное усиление экспрессии α - и β -цепей интегрина Mac-1, CD66b и CD9 на мембране эозинофилов, тогда как презентация других молекул адгезии (CD69, CD29, CD49b и CD44) существенно не изменяется [1].

Проведенное нами *in vitro* исследование уровня экспрессии молекул CD9 и CD18 (общая субъединица Mac-1, LFA-1 и CR4) на эозинофилах, выделенных из крови больных туберкулезом легких, позволило констатировать достоверное увеличение абсолютного и относительного количества CD18-позитивных клеток у больных туберкулезом легких с эозинофилией и без таковой. Количество эозинофилов, несущих молекулу CD9, у всех больных соответствовало контрольным значениям. При этом у пациентов с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, содержание CD18-презентирующих эозинофилов достоверно превышало аналогичный параметр у больных без эозинофилии (табл. 1).

Это может быть связано со способностью IL-5 (концентрация которого оказалась достоверно повышенной у больных туберкулезом с эозинофилией) усиливать экспрессию на мембране эозинофилов Mac-1 и LFA-1, имеющих общую субъединицу (CD18).

На ряду с молекулами адгезии эозинофильные гранулоциты презентуют toll-подобные рецепторы типа 2 (TLR-2) и $\gamma\delta$ T-клеточный рецептор, посредством которых они взаимодействуют с *M. tuberculosis*, в результате чего происходит высвобождение α -дефензинов и эозинофильной пероксидазы, обладающих выраженным бактерицидным действием [4, 5]. Используя перекись водорода, галогениды (бромид, хлорид или йодид) и псевдогалогениды (тиоционат), эозинофильная пероксидаза опосредует образование высокорекреационных продуктов, взаимодействующих с тиоловыми группами клеточной стенки бактерий, что приводит к усилению её проницаемости. В свою очередь, анион гипотиоциановой кислоты, образующийся в ходе реакции,

блокирует гликолиз и НАДФ-зависимые реакции бактерий [1]. Эозинофильная пероксидаза способна также потенцировать цитотоксичность лизосомальных катион-

ных белков, которые повышают клеточную проницаемость, усиливают хемотаксис лейкоцитов в очаг воспаления, опосредуют фагоцитарную активность клеток [3].

Таблица 1

Содержание CD9- и CD18-позитивных эозинофилов в крови у больных туберкулезом легких (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	Ед.	CD9-позитивные эозинофилы	CD18-позитивные эозинофилы
Здоровые доноры	%	3,020 (2,010–3,740)	5,360 (3,370–6,750)
	×10 ⁹	0,002 (0,001–0,002)	0,003 (0,002–0,004)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	%	3,386 (3,125–5,120) p ₁ > 0,05	21,540 (19,49–24,36) p ₁ < 0,05
	×10 ⁹	0,036 (0,310–0,050) p ₁ > 0,05	0,204 (0,185–0,273) p ₁ < 0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	%	4,425 (3,620–5,193) p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	12,670 (9,85–20,48) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05
	×10 ⁹	0,009 (0,008–0,010) p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05	0,027 (0,020–0,043) p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: p₁ – уровень статистической значимости различий по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p₂ – у больных туберкулезом легких с эозинофилией.

Изучение активности эозинофильной пероксидазы при туберкулезе легких позволило констатировать снижение данного показателя у всех больных, независимо от наличия эозинофильной реакции крови (по сравнению с нормой) (табл. 2). Данные изменения могут являться следствием усиления функциональной активности эозинофильных клеток, обладающих повышенной чувствительностью к различным эндо- и экзогенным стимулам, что способствует их дегрануляции. При этом у больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, активность эозинофильной пероксидазы оказалась достоверно выше, чем у больных туберкулезом

без эозинофилии (табл. 2). Данный факт позволяет судить о более высоком цитотоксическом потенциале эозинофильных клеток, реализация которого может иметь несомненно позитивное значение, опосредуя повреждение и эффективный лизис *M. tuberculosis*. Однако цитотоксические протеины, высвобождающиеся при дегрануляции эозинофилов, способны инициировать специфические морфологические изменения легочной ткани, оказывать повреждающее действие на эндотелий сосудов и миелиновые нервные волокна, стимулировать процессы фиброобразования и тем самым осложнять течение инфекционного процесса [6].

Таблица 2

Активность пероксидазы эозинофильных гранулоцитов у больных туберкулезом легких, мккат/г (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	Содержание эозинофилов в периферической крови
Здоровые доноры	236,17 (181,50–299,80)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	142,13 (114,5–181,15) p ₁ < 0,05
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	96,65 (85,10–176,50) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05

Противомикробный потенциал эозинофильных гранулоцитов может быть реализован за счет способности этих клеток к фагоцитозу. Известно, что эозинофилы поглощают

бактерии с последующим их расщеплением путем генерации высокотоксичных супероксидных и нитроксидных радикалов, инициирующих процессы перекисного окисления

мембранных липидов бактериальной стенки. Вместе с тем процесс деградации микробной клетки происходит под влиянием кислой реакции, создаваемой внутри фаголизосомы при участии гидролитических ферментов и лизосомальных белков [4, 7].

В ходе настоящего исследования было зарегистрировано увеличение содержания фагоцитирующих эозинофилов у больных туберкулезом легких с эозинофилией и без таковой. При этом абсолютное содержание фагоцитирующих клеток у больных туберкулезом, сопровождающимся эозинофилией, достоверно превышало соответствующий параметр у больных, в крови которых количество эозинофилов соответствовало норме (табл. 3). Полученные нами данные согласуются с результатами Л.С. Литвиновой и соавт. [2007], констатирующими факт

увеличения числа эозинофилов с высоким биоцидным потенциалом (по отложению гранул диформаза в НСТ-тесте) у лиц, страдающих лимфопролиферативными заболеваниями системы крови, и у пациентов с описторхозом, ассоциированными с эозинофилией крови. Усиление фагоцитарной активности эозинофильных гранулоцитов крови при заболеваниях инфекционной и неинфекционной природы опосредует эффективную элиминацию патогена (в том числе микобактерий) из организма. Однако, учитывая способность особо вирулентных *M. tuberculosis* снижать бактерицидный потенциал эффекторных клеток, высока вероятность формирования незавершенного фагоцитоза, в результате чего эозинофилы могут являться дополнительным резервуаром персистенции микобактерий.

Таблица 3

Фагоцитарная активность эозинофилов крови у больных туберкулезом легких (Me (Q1-Q3))

Группы обследованных лиц	Ед.	Содержание эозинофилов в периферической крови	Количество фагоцитирующих <i>E. coli</i> эозинофилов
Здоровые доноры	%	1,230 (0,890–1,570)	8,790 (6,170–10,340)
	$\times 10^9$	0,070 (0,030–0,080)	0,006 (0,004–0,007)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	%	8,810 (6,870–12,830) $p_1 < 0,05$	19,290 (16,200–23,350) $p_1 < 0,05$
	$\times 10^9$	0,950 (0,740–1,390) $p_1 < 0,05$	0,178 (0,149–0,234) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	%	2,110 (1,230–3,790) $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	13,030 (9,810–15,520) $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$
	$\times 10^9$	0,210 (0,110–0,370) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	0,027 (0,018–0,320) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Таким образом, при туберкулезе легких (особенно в сочетании с эозинофильной реакцией крови) эозинофильные гранулоциты обладают высокой активностью в отношении дальнейшей аккумуляции в очаге гранулематозного воспаления (за счет повышенной экспрессии молекул адгезии) с последующей реализацией своего микробцидного потенциала, действие которого может быть направлено как в отношении бактерий, так и «здоровой» ткани легкого.

Выводы

1. У больных туберкулезом легких вне зависимости от наличия эозинофильной реакции крови усиление адгезивных свойств и фагоцитарной функции эозинофилов сочетается с понижением активности эозинофильной пероксидазы.

2. У больных туберкулезом легких с эозинофилией содержание CD18-презентирующих эозинофилов и активность эозинофильной пероксидазы выше, чем у больных без эозинофилии.

Исследование выполнено в рамках реализации Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (Соглашения №14.А18.21.0206 и №14.А18.21.0174).

Список литературы

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии: в 3т. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Ньюдиализ, 2003. – Т.2. – 312 с.
2. Borelli V., Vita F., Shankar S., Soranzo M.R. Human Eosinophil Peroxidase Induces Surface Alteration, Killing, and Lysis of *Mycobacterium tuberculosis* // *Infection and immunity*. – 2003. – Vol.71. – P. 605–613.

3. Kirman J., Zakaria Z., McCoy K. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice // *Infect Immun.* – 2009. – Vol. 68, №5. – P. 2976–2978.

4. Kunkel E.J., Butcher E.C. Chemokines and the tissuespecific migration of leucocytes // *Immunity.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1–4.

5. Lacy P., Abdel Latif D., Steward M., Musat-Marcu S., Man S.F., Moqbel R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects // *J Immunol.* – 2003. – Vol. 170. – P. 2670–2679.

6. Legrand F., Driss V., Woerly G. A Functional $\gamma\delta$ TCR / CD3 Complex Distinct from $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils // *PLoS ONE.* – 2009; 4(6): e5926. www.plosone.org (дата обращения 23.05.12).

7. Nagase H., Okugawa S., Ota Y. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand // *J. Immunol.* – 2003. – Vol. 171. – P. 3977–3982.

8. Rothenberg M.E., Hogan S.P. The eosinophil // *Annu Rev Immunol.* – 2006. – Vol. 24, № 1. – P. 147–174.

9. Tachimoto H., Bochner B.S. The surface phenotype of human eosinophils // *Chem Immunol.* – 2000. – Vol. 76. – P. 45–62.

Reference

1. Vorobev A.I. *Rukovodstvo po gematologii: v 3t. 3-e izd. pererabotannoe i dopolnennoe.* – М.: N'judializ, 2003, T.2, pp. 312.

2. Borelli V., Vita F., Shankar S., Soranzo M.R. Human Eosinophil Peroxidase Induces Surface Alteration, Killing, and Lysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. and Immun.*, 2003, Vol. 71, pp. 605–613.

3. Kirman J., Zakaria Z., McCoy K. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice. *Infect. and Immun.*, 2009, Vol. 68, no. 5, pp. 2976–2978.

4. Kunkel E.J., Butcher E.C. Chemokines and the tissuespecific migration of leucocytes. *Immunity*, 2002, Vol. 16, pp. 1–4.

5. Lacy P., Abdel Latif D., Steward M., Musat-Marcu S., Man S.F., Moqbel R. Divergence of mechanisms regulating respiratory burst in blood and sputum eosinophils and neutrophils from atopic subjects. *J Immunol.*, 2003, Vol. 170, pp. 2670–2679.

6. Legrand F., Driss V., Woerly G. A Functional $\gamma\delta$ TCR / CD3 Complex Distinct from $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils. *PLoS ONE*, 2009; 4(6): e5926. www.plosone.org (data obrascheniya 23.05.12)

7. Nagase H., Okugawa S., Ota Y. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand, *J Immunol.*, 2003, Vol. 171, pp. 3977–3982.

8. Rothenberg M.E., Hogan S.P. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.*, 2006, Vol. 24, no. 1, pp. 147–174.

9. Tachimoto H., Bochner B.S. The surface phenotype of human eosinophils. *Chem Immunol.*, 2000, Vol. 76, pp. 45–62.

Рецензенты:

Карпова М.Р., д.м.н., профессор кафедры микробиологии и вирусологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, г. Томск;

Филинюк О.В., д.м.н., доцент, и.о. зав. кафедрой фтизиатрии и пульмонологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 28.07.2012.