

УДК 616.24-002.5:616.155.34.075:577.1.016.7.04

ФАКТОРЫ АККУМУЛЯЦИИ И МИГРАЦИИ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**Колобовникова Ю.В.***ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Томск, e-mail: office@ssmu.ru*

В статье проанализированы основные факторы, опосредующие накопление эозинофильных гранулоцитов в крови и очаге воспаления при туберкулезе легких (IL-5RA, CD9, CD18 и CCR3). В ходе проведенного исследования установлено, что туберкулезная инфекция (особенно в сочетании с эозинофилией) характеризуется увеличением числа эозинофильных гранулоцитов, экспрессирующих IL-5RA – маркер активации эозинофилов, а также повышением количества эозинофилов, несущих CD18 и CCR3 – рецепторные структуры, опосредующие процессы адгезии и хемотаксиса клеток. Высокий уровень экспрессии изученных поверхностных маркеров обеспечивает длительное пребывание эозинофилов в кровотоке с последующей аккумуляцией в очаге гранулематозного воспаления при заражении *Micobacterium tuberculosis*. В гранулема лейкоциты эозинофильного ряда способны вызывать деградацию патогена, однако в большей степени деструктивный потенциал изученных клеток может быть реализован в отношении интактной ткани легкого.

Ключевые слова: эозинофилы, эозинофилия, рецепторы, молекулы адгезии, хемотаксис, туберкулез легких**FACTORS OF ACCUMULATION AND MIGRATION OF EOSINOPHILIC GRANULOCYTES IN PULMONARY TUBERCULOSIS****Kolobovnikova Y.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*

In this article, the main factors that mediate the accumulation of eosinophilic granulocytes in blood and focus of inflammation in pulmonary tuberculosis (IL-5RA, CD9, CD18 and CCR3) were analyzed. In the course of the conducted research, we established that a TB infection (especially in combination with eosinophilia) is characterized by an increase in the number of eosinophilic granulocytes expressing IL-5RA – the marker of activation of eosinophils, as well as an increase in the number of eosinophils carrying CD18 and CCR3 – the receptor structures mediating the processes of adhesion and chemotaxis of cells. High level of expression of the studied surface markers provides a prolonged stay of eosinophils in the blood stream with subsequent accumulation in the focus of granulomatous inflammation during *Micobacterium tuberculosis* infection. In granuloma, the leukocytes of eosinophilic range can cause degradation of the pathogen, however, the destructive potential of the studied cells can to a far greater degree be realized with respect to the intact lung tissue.

Keywords: eosinophils, eosinophilia, receptors, adhesion molecules, chemotaxis, pulmonary tuberculosis

На моделях лабораторных животных продемонстрировано накопление эозинофилов в очаге гранулематозного воспаления, вызванного *Micobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. smegmatis* [6, 7, 9]. Эозинофильные гранулоциты (в большом количестве) обнаруживаются в ткани легкого и бронхоальвеолярных смывах, а также в периферической крови лабораторных животных и человека с туберкулезной инфекцией [2, 3, 9]. Авторы высказывают предположения о способности самих бактерий выступать в роли эозинофил-аккумулирующих агентов за счет термолabile компонентов клеточной стенки либо высвобождения факторов, оказывающих стимулирующий эффект в отношении эозинофилов [6, 9]. В то же время известны многие цитокины и рецепторные структуры на эозинофильных гранулоцитах, обуславливающие пролонгированное пребывание этих клеток в кровотоке с последующей их миграцией в тканевые компартменты макроорганизма при различных заболеваниях [4, 5, 8, 10].

Открытым остается вопрос, посредством каких именно механизмов происходит накопление эозинофилов в крови и тканях при туберкулезе легких.

В связи с этим целью настоящего исследования явилась оценка ключевых факторов, опосредующих пролонгированное пребывание эозинофильных гранулоцитов в крови и аккумуляцию их в очаге воспаления при туберкулезе легких.

Материал и методы исследования

Под наблюдением находилось 37 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 содержания эозинофилов в периферической крови были сформированы две основные группы исследования: первую группу составили 17 пациентов с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией (абсолютное число эозинофилов со-

ответствовало $(0,85 \pm 0,01)$ Г/л, относительное – $(8,00 \pm 0,46)\%$, во вторую группу вошли 20 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 18 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. Оценку экспрессии рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов осуществляли на клетках, предварительно выделенных на прерывистом градиенте плотности Percoll («Sigma Life Science», США). Для определения уровня экспрессии IL-5RA, CCR3, 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 протоколам фирмы-производителя («Becton Dickinson», США). Измерения производили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованном аргон-

вым лазером длиной волны 488 нм и стандартными фильтрами. Анализ полученных данных осуществляли при помощи программного приложения BD: CellQuest for Mac OS® X. Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение

Ключевым фактором, регулирующим гомеостаз эозинофильных гранулоцитов, является IL-5 (эозинофилопоэтин). Связывание последнего с комплементарными рецепторами (IL-5RA) приводит к запуску механизмов сигнальной трансдукции, экспрессии определенных генов и, как следствие, изменению функциональной активности клеток [4, 5, 8, 10]. Дисбаланс рецепторного аппарата эозинофильных гранулоцитов (увеличение или снижение числа рецепторных структур, слабый аффинитет, наличие растворимых форм рецептора), несомненно, изменяет функциональный статус изучаемых клеток.

В результате проведенного исследования экспрессии рецепторов к IL-5 в культуре эозинофилов *in vitro*, выделенных из крови больных туберкулезом легких, было установлено достоверное увеличение содержания IL-5RA-позитивных клеток у пациентов с туберкулезной инфекцией, сопровождающейся эозинофилией (табл. 1).

Таблица 1

Содержание IL-5RA- и CCR3-позитивных клеток в *in vitro* культуре эозинофилов крови у больных туберкулезом легких (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	IL-5RA ⁺ -эозинофилы		CCR3 ⁺ -эозинофилы	
	Интактная культура	С рекомбинантным IL-5	Интактная культура	С рекомбинантным IL-5
Здоровые доноры	5,160 (3,713–6,450)	7,620 (5,910–11,781) $p_3 < 0,05$	6,340 (5,120–7,020)	18,870 (9,130–20,720) $p_3 < 0,05$
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	22,581 (19,200–24,315) $p_1 < 0,05$	39,880 (34,450–55,153) $p_1 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	8,970 (3,140–16,380) $p_1 < 0,05$	13,470 (10,320–21,610)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	6,682 (5,815–11,520) $p_2 < 0,05$	11,930 (9,825–24,448) $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	35,522 (14,567–49,520) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	41,295 (29,362–49,284) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией; p_3 – по сравнению с базальной культурой клеток внутри одной группы обследованных.

Увеличение пула эозинофильных клеток, несущих IL-5RA, в сочетании с высоким содержанием IL-5 в крови (по данным

предыдущих исследований) [2] указывает на то, что эозинофилы при туберкулезе легких находятся в состоянии активации

и способны реализовать функциональный потенциал в отношении окружающих тканей. В исследованиях, проведенных ранее, также показано достоверное повышение секреции IL-5 самими эозинофильными гранулоцитами крови у больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией [3]. Это подтверждает способность эозинофилов выступать в качестве аутокринного регулятора своей собственной активации, опосредуя длительное пребывание клеток в периферической крови при туберкулезе легких.

Следует отметить, что IL-5 обладает ярко выраженной хемотаксической активностью в отношении эозинофилов крови, увеличивая экспрессию молекул адгезии на их мембране (LFA-1, Mac-1, VLA-4 и др.) и клетках сосудистого эндотелия (ICAM-1, 2, 3) [1, 5, 10]. Посредством адгезионных молекул семейства β_2 - (CD11a/CD18 (Mac-1), CD11b/CD18 (LFA-1)) и β_1 -интегринов (VLA-4), а также CD9 (семейство тетраспанинов) осуществляется прочная адгезия

и миграция эозинофилов через сосудистый эндотелий. Молекула CD9 участвует преимущественно в агрегации эозинофильных гранулоцитов и их адгезии к фибронектину [10]. При воспалительных процессах различного генеза происходит значительное усиление экспрессии α - и β -цепей интегрина Mac-1, CD66b и CD9 на мембране эозинофилов, в свою очередь презентация молекул адгезии CD69, CD29, CD49b и CD44 существенно не изменяется [1].

В ходе настоящего исследования была проведена оценка уровня экспрессии CD18 (общая субъединица молекул адгезии Mac-1, LFA-1 и CR4) и CD9 на эозинофилах, выделенных из крови больных туберкулезом легких *in vitro*. У всех пациентов с туберкулезом легких независимо от наличия эозинофильной реакции крови было зарегистрировано достоверное увеличение абсолютного и относительного количества CD18-позитивных клеток на фоне сопоставимого с контролем содержания эозинофилов, экспрессирующих молекулу CD9.

Таблица 2

Содержание CD9⁺- и CD18⁺-клеток в *in vitro* культуре эозинофилов крови у больных туберкулезом легких (%) (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	CD9 ⁺ -эозинофилы	CD18 ⁺ -эозинофилы
Здоровые доноры	3,020 (2,010–3,840)	5,360 (3,370–6,750)
Больные туберкулезом легких с эозинофилией	3,273 (3,125–5,150)	20,970 (18,490–24,360) $p_1 < 0,05$
Больные туберкулезом легких без эозинофилии	3,173 (2,620–5,231)	11,010 (9,85–15,92) $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: p_1 – уровень статистической значимости по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у больных туберкулезом легких с эозинофилией.

При этом у пациентов с туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, содержание CD18-презентирующих эозинофилов достоверно превышало аналогичный параметр у больных без эозинофилии (табл. 2), что может быть связано с активирующим влиянием IL-5 в отношении экспрессии Mac-1 и LFA-1 на мембране эозинофильных гранулоцитов.

Дальнейшее привлечение эозинофилов в очаг гранулематозного воспаления осуществляется при участии хемокинов и экспрессии соответствующих рецепторов. Специфическими хематрактантами эозинофилов принято считать эотаксины, основная функция которых заключается в активации хемотаксиса эозинофилов из кровотока в ткани [5, 6].

В тканях эотаксины индуцируют дегрануляцию эозинофилов и продукцию активных форм кислорода, выступая в роли провоспалительных агентов [10]. Реализация основных свойств эотаксинов, в частности, эотаксина-1 (CCL11), возможна лишь при связывании со специфическим рецептором CCR3, экспрессируемым на мембране эозинофилов и характеризующимся высокой селективностью к своему лиганду [5].

Анализируя содержание эозинофилов, несущих рецептор к CCL11, в интактной культуре эозинофильных гранулоцитов, было показано достоверное увеличение CCR3-позитивных клеток у больных туберкулезом легких с эозинофилией и без таковой по сравнению с аналогичным пара-

метром в контрольной группе (см. табл. 1). При этом наибольшее количество CCR3-несущих эозинофилов было зарегистрировано у больных туберкулезом легких без эозинофилии. Высокая экспрессия CCR3 на эозинофильных гранулоцитах при туберкулезе легких, по всей видимости, индуцирует усиление адгезии эозинофилов к сосудистой стенке эндотелию с последующей миграцией клеток в очаг воспаления.

Наряду с изучением базального уровня экспрессии рецепторов на мембране эозинофилов крови (фоновая активность клеток) в ходе настоящего исследования был проанализирован резерв рецептор-экспрессирующей функции клеток при добавлении *in vitro* экзогенного рекомбинантного IL-5 (rIL-5). В результате было установлено достоверное увеличение содержания IL-5RA-положительных эозинофилов у всех больных туберкулезом легких при одновременном повышении числа CCR3-несущих эозинофилов лишь у пациентов с туберкулезом легких без эозинофилии по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров (см. табл. 1). Значение индекса стимуляции, отражающего соотношение клеток в культуральной суспензии эозинофилов с рекомбинантным белком к таковому в интактной культуре, достоверно превышало контрольные показатели для рецептора к IL-5 у всех больных туберкулезом легких вне зависимости от наличия эозинофилии крови. При этом у больных туберкулезом легких без эозинофилии изменения со стороны индуцированной экспрессии CCR3 выражались в виде снижения индекса стимуляции.

Выявленные изменения могут свидетельствовать об увеличении функционального резерва эозинофильных гранулоцитов, характеризующего способность клеток экспрессировать рецепторы к IL-5 – ключевому цитокину, регулирующему их активность.

Таким образом, при туберкулезе легких (особенно в сочетании с эозинофильной реакцией крови) эозинофильные гранулоциты крови характеризуются высокой активностью в отношении экспрессии ключевых рецепторных структур, опосредующих процессы активации, адгезии и хемотаксиса клеток. Высокий уровень экспрессии изученных поверхностных маркеров указывает на то, что эозинофилы крови способны к дальнейшей аккумуляции в очаге гранулематозного воспаления,

вызванного *Micobacterium tuberculosis*, с последующей реализацией своего агрессивного цитотоксического потенциала, действие которого может быть направлено как в отношении микобактерий, так и интактной ткани легкого.

Выводы

1. У больных туберкулезом легких повышено содержание эозинофильных гранулоцитов, экспрессирующих IL-5RA, CD18 и CCR3 – рецепторы, опосредующие процессы активации, адгезии и хемотаксиса клеток.

2. У больных туберкулезом легких с эозинофилией количество IL-5RA- и CD18-положительных эозинофилов выше, чем у больных без эозинофилии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Совета по грантам Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых – кандидатов медицинских наук (Конкурс – МК-2013). Договор № 14.124.13.3383-МК.

Список литературы

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии: в 3 т. – 3-е изд. перераб. и доп. – М.: Ньюдиализ, 2003. – Т.2. – 312 с.
2. Роль интерлейкина-5 и эотаксина в формировании эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Медицинская иммунология. – 2011. – Т. 13, № 2-3. – С. 273–278.
3. Молекулярные механизмы формирования эозинофилии крови при туберкулезе легких / Ю.В. Колобовникова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Вестник РАМН. – 2012. – № 5. – С. 58–62.
4. Barnes P.J. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines / P.J. Barnes // The Journal of Immunology. – 2003. – Vol. 170, № 8. – P. 5359–5366.
5. Blanchard C., Rothenberg M.E. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol.* – 2009. – Vol. 101. – P. 81–121.
6. Castro A.G. Live but Not Heat-Killed Mycobacteria Cause Rapid Chemotaxis of Large Numbers of Eosinophils In Vivo and Are Ingested by the Attracted Granulocytes / A.G. Castro, N. Esaguy, P. Macedo et al. // *Infection and immunity.* – 1991. – Vol. 59, № 9. – P. 3009–3014.
7. 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.
8. Kunkel E.J., Butcher E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of leucocytes // *Immunity.* – 2002. – Vol. 16. – P. 1–4.
9. Lasco T.M. Rapid Accumulation of Eosinophils in Lung Lesions in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis* / T.M. Lasco, O.C. Turner, L. Cassone // *Infect Immun.* – 2004. – Vol. 72 (2). – P. 1147–1149.
10. Park Y.M., Bochner B.S. Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease. *Allergy Asthma Immunol Res.* – 2010. – Vol. 2(2). – P. 87–101.

References

1. Vorob'ev A.I. Rukovodstvo po gematologii: v 3t.- 3-e izd. pererabotannoe i dopolnnoe. M.: N'judializ, 2003. T.2. 312 p.
2. Kolobovnikova Ju.V., Urazova O.I., Novickij V.V. i soavt. Rol' interlejkina-5 i jeotaksina v formirovanii jeozinofil'noj reakcii krovi pri tuberkuleze legkih // Medicinskaja immunologija. 2011. T. 13, no. 2–3. pp. 273–278.
3. Kolobovnikova Ju.V., Urazova O.I., Novickij V.V. i soavt. Molekuljarnye mehanizmy formirovanija jeozinofilii krovi pri tuberkuleze legkih // Vestnik RAMN. 2012. no. 5. pp. 58–62.
4. Barnes P.J. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines // The Journal of Immunology. 2003. Vol. 170, no. 8. pp. 5359–5366.
5. Blanchard C., Rothenberg M.E. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol.* 2009. Vol. 101. pp. 81–121.
6. Castro A.G. Live but Not Heat-Killed Mycobacteria Cause Rapid Chemotaxis of Large Numbers of Eosinophils In Vivo and Are Ingested by the Attracted Granulocytes / A.G. Castro, N. Esaguy, P. Macedo et al. // *Infection and immunity.* 1991. Vol. 59, no. 9. pp. 3009–3014.
7. 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). pp. 2976–2978.
8. Kunkel E.J., Butcher E.C. Chemokines and the tissue-specific migration of leucocytes // *Immunity.* 2002. Vol. 16. pp. 1–4.
9. Lasco T.M. Rapid Accumulation of Eosinophils in Lung Lesions in Guinea Pigs Infected with *Mycobacterium tuberculosis* / T. M. Lasco, O.C. Turner, L. Cassone // *Infect Immun.* 2004. Vol. 72 (2). pp. 1147–1149.
10. Park Y.M., Bochner B.S. Eosinophil Survival and Apoptosis in Health and Disease. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2010. Vol. 2(2). pp. 87–101.

Рецензенты:

Агафонов В.И., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории патологической физиологии ФГБУ НИИ Фармакологии СО РАМН, г. Томск;

Зима А.П., д.м.н., профессор кафедры молекулярной медицины и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.

Работа поступила в редакцию 12.03.2013.