

РОЛЬ IL-5 И ЭОТАКСИНА В ФОРМИРОВАНИИ ЭОЗИНОФИЛЬНОЙ РЕАКЦИИ КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Колобовникова Ю.В., Уразова О.И., Новицкий В.В.,
Литвинова Л.С., Воронкова О.В., Наследникова И.О.,
Михеева К.О., Игнатов М.В.

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства
по здравоохранению и социальному развитию», г. Томск

Резюме. С привлечением современных иммунологических методов исследования освещены некоторые аспекты механизмов формирования эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких. Установлено, что ключевым фактором, обуславливающим развитие гемической эозинофилии при заражении *M. tuberculosis*, является IL-5, концентрация которого оказалась достоверно выше в сыворотке крови у пациентов с туберкулезной инфекцией, сопровождающейся эозинофилией. Эотаксин — хемокин, специфично действующий в отношении эозинофильных клеток, с одной стороны, опосредует пролонгированное пребывание эозинофилов в кровотоке, а с другой — инициирует процесс адгезии эозинофильных лейкоцитов к эндотелию сосудов с последующей их миграцией в очаг гранулематозного воспаления.

Ключевые слова: туберкулез легких, эозинофилия, цитокины.

Kolobovnikova U.V., Urazova O.I., Novitsky V.V., Litvinova L.S., Voronkova O.V., Naslednikova I.O., Mikheeva K.O., Ignatov M.V.

ROLE OF IL-5 AND EOTAXIN IN DEVELOPMENT OF BLOOD EOSINOPHILIC REACTION DURING PULMONARY TUBERCULOSIS

Abstract. The study considers some aspects of pathogenetic mechanisms underlying blood eosinophilic reactions developing in pulmonary tuberculosis, taking into account some novel data obtained by means of modern immunological techniques. It was revealed that IL-5 is among key factors determining eosinophilic reactions of blood following infection with *M. tuberculosis*. Blood serum IL-5 concentrations proved to be significantly higher in patients with tuberculosis accompanied by eosinophilia. In these cases, eotaxin is a chemokine, which selectively acts upon eosinophilic cells. Its effects include prolonged persistence of eosinophils in bloodstream, along with initiation of eosinophil adherence to vascular endothelium, thus enabling subsequent migration of eosinophilic leukocytes to the foci of specific granulomatous inflammation. (*Med. Immunol.*, 2011, vol. 13, N 2-3, pp 273-278)

Keywords: lung tuberculosis, eosinophilia, cytokines.

Введение

Содержание эозинофильных гранулоцитов в периферической крови при туберкулезной

инфекции может варьировать от повышенного до анэозинофилии [1, 4]. Отечественные исследователи рассматривают феномен эозинофилии при туберкулезе лишь в качестве побочного эффекта проводимой противотуберкулезной химиотерапии, связывая его возникновение с прямым действием антибактериальных средств и изначальной аллергической «настроенностью» организма к препаратам [4]. В то же время в совре-

Адрес для переписки:

Колобовникова Юлия Владимировна
634050, г. Томск, Московский тракт, 2.
Тел.: (3822) 55-36-13.
E-mail: kolobovnikova.julia@mail.ru

менной литературе представлен ряд работ, описывающих избыточное количество эозинофилов в крови у больных туберкулезом до назначения специфической терапии [1, 10, 12]. Однако все они лишь констатируют факт гемической эозинофилии, не акцентируя на механизмах формирования и биологической целесообразности данной гематологической реакции при туберкулезной инфекции.

90% всех эозинофильных лейкоцитозов, сопровождающих различные заболевания, составляют реактивные (симптоматические) эозинофилии, развивающиеся в ответ на повышенную продукцию Т-лимфоцитами хелперами (Th) типа 2 эозинофилактивирующих медиаторов [3, 5, 8, 14]. Известно, что инфекция, вызванная *M. tuberculosis*, характеризуется дисбалансом продукции цитокинов, регулирующих клеточные и гуморальные реакции иммунитета [1, 2]. Преобладание активности последних, по-видимому, может обуславливать формирование эозинофильной реакции крови при туберкулезе легких. В связи с этим, целью настоящего исследования явилась оценка содержания ключевых иммунорегуляторных цитокинов, опосредующих Th2 иммунный ответ, регулирующих гомеостаз эозинофильных гранулоцитов (IL-5 и эотаксина) в сыворотке крови у больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией и без эозинофилии.

Материалы и методы

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 легких, 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, во вторую группу вошли 19 больных туберкулезной инфекцией без эозинофилии.

Группу сравнения (контроль) составили 12 здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу и возрасту.

Набор материала для исследования у больных туберкулезом легких во всех случаях проводили

до начала специфической противотуберкулезной терапии.

Материалом исследования служила венозная кровь.

Определение общего количества лейкоцитов, абсолютного и относительного числа эозинофильных гранулоцитов осуществляли общепринятыми гематологическими методами. Концентрацию эозинофилактивирующих цитокинов определяли в сыворотке периферической крови и культуральных жидкостях. Выделенные на градиенте плотности Percoll ($\rho = 1,133$ г/л) («Sigma Life Science», США) эозинофильные лейкоциты (2×10^6 клеток/мл) культивировали в полной питательной среде, состоящей из 90% RPMI-1640, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («Sigma», США), 0,3 мг/мл L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицин и 5% CO₂, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Содержание цитокинов в сыворотке крови и супернатантах клеточных культур оценивали с применением твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода в соответствии с инструкциями, прилагаемыми производителем тест-систем («Biosource», США). Оптическую плотность растворов регистрировали на микропланшетном фотометре Multiskan EX («ThermoLabSystems», Финляндия). Результаты исследования обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенного нами исследования было установлено наличие умеренной эозинофилии периферической крови у 16 больных инфильтративным (7 человек) и диссеминированным (9 человек) туберкулезом легких (из 80 обследованных лиц с туберкулезной инфекцией) до назначения специфической терапии. При этом достоверных различий в количестве эозинофилов у пациентов с инфильтративной и диссеминированной формами туберкулезной инфекции выявлено не было (табл. 1), несмотря на то, что диссеминированный вариант туберкулеза легких характеризуется более выраженным дисбалансом цитокинов с преобладанием медиаторов, опосредующих гуморальный иммунитет, многие из которых принимают активное участие в регуляции процессов пролиферации, дифференцировки и активации лейкоцитов эозинофильного ряда [1, 2].

Анализируя содержание IL-5 – основного медиатора гуморального звена иммунного ответа,

ТАБЛИЦА 1. ОБЩЕЕ КОЛИЧЕСТВО ЛЕЙКОЦИТОВ, СОДЕРЖАНИЕ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ ($\bar{X} \pm m$)

Группы обследованных лиц	Общее количество лейкоцитов, ($\times 10^9/\text{л}$)	Содержание эозинофилов	
		%	$\times 10^9/\text{л}$
Здоровые доноры	5,61 \pm 0,35	1,23 \pm 0,30	0,07 \pm 0,01
Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией	9,94 \pm 0,56 $p_1 < 0,05$	7,33 \pm 0,38 $p_1 < 0,05$	0,73 \pm 0,01 $P_1 < 0,05$
Пациенты с диссеминированным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией	11,66 \pm 0,49 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	8,78 \pm 1,03 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	1,02 \pm 0,01 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких без эозинофилии	9,83 \pm 1,52 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	1,50 \pm 0,50 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,15 \pm 0,01 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$
Пациенты с диссеминированным туберкулезом легких без эозинофилии	10,26 \pm 0,56 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$	1,89 \pm 0,68 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	0,19 \pm 0,01 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$

Примечание. p_1 – уровень статистической значимости по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p_2 – у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией; p_3 – у пациентов с диссеминированным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией.

регулирующего гомеостаз эозинофильных клеток, в сыворотке крови при туберкулезной инфекции, нами было установлено увеличение данного показателя у больных туберкулезом, сопровождающимся эозинофилией; при этом сывороточный уровень IL-5 у пациентов с туберкулезной инфекцией без эозинофилии не отличался от контрольных значений (табл. 2). Известно, что IL-5 совместно с IL-3 и GM-CSF, избирательно стимулирует образование эозинофильных гранулоцитов из их коммитированного предшественника, активирует дегрануляцию эозинофилов и высвобождение цитотоксичных протеинов, регулирует экспрессию разнообразных поверхностных маркеров и посредством ингибирования апоптотической гибели эозинофильных клеток пролонгирует время их пребывания в кровотоке [5, 11, 14].

Главными продуцентами IL-5 являются Th2-лимфоциты, тучные клетки и сами эозинофилы [5]. В настоящем исследовании мы попытались оценить способность эозинофильных гра-

нулоцитов секретировать данный цитокин в интактной культуре клеток и при добавлении в культуральную суспензию вакцинного штамма BCG (живой аттенуированный штамм *M. bovis*). Выбор индуктора, в частности, был обусловлен способностью лейкоцитов эозинофильного ряда непосредственно взаимодействовать с микобактериями различных видов с последующим высвобождением широкого спектра цитокиновых молекул [13]. Как показали результаты проведенных нами исследований, спонтанная и BCG-индуцированная секреция IL-5 эозинофильными гранулоцитами периферической крови оказалась достоверно выше у больных туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров и у пациентов с туберкулезной инфекцией без эозинофилии (табл. 2). Приведенные выше данные позволяют предполагать, что эозинофильные гранулоциты, обладающие высокой резервной реактивностью секретировать эозинофилактирующие цитокины, способны вы-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТАХ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СУСПЕНЗИЙ ЭОЗИНОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ (ПГ/МЛ) У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ (Me (Q₁-Q₃))

Группы обследованных лиц	IL-5 (сыворотка)	Эотаксин (сыворотка)	IL-5 (культура клеток)	
			Интактная	BCG-индуциро- ванная
Здоровые доноры	0,799 (0,756-1,944)	2519 (1827-3431)	3,025 (2,131-4,753)	4,457 (2,510-5,618)
Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией	5,296 (3,565-6,481) p ₁ < 0,05	4252 (2609-5138) p ₁ < 0,05	5,617 (4,696-6,080) p ₁ < 0,05	7,273 (5,834-11,081) p ₁ < 0,05
Пациенты с диссеминированным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией	5,402 (2,809-6,518) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	4708 (3478-5649) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	5,565 (3,673-7,345) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05	7,589 (4,736-8,604) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05
Пациенты с инфильтративным туберкулезом легких без эозинофилии	1,080 (0,864-3,673) p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	2821 (2537-3796) p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	2,269 (1,319-2,809) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	1,728 (1,512-3,457) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05
Пациенты с диссеминированным туберкулезом легких без эозинофилии	0,822 (0,731-1,081) p ₁ > 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05	3956 (2945-4851) p ₁ < 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ > 0,05	2,593 (1,522-4,537) p ₁ > 0,05 p ₂ > 0,05 p ₃ < 0,05	2,131 (1,136-3,457) p ₁ < 0,05 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,05

Примечание. p₁ – уровень статистической значимости по сравнению с аналогичными параметрами у здоровых доноров; p₂ – у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией; p₃ – у пациентов с диссеминированным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией.

ступать в качестве аутокринного регулятора своей собственной дифференцировки и/или активации, опосредуя дальнейшее пребывание эозинофилов в периферической крови при туберкулезе легких [5, 9, 11].

В ходе настоящего исследования нами было зарегистрировано также достоверное повышение уровня эотаксина – медиатора, модулирующего функциональную активность эозинофильных гранулоцитов, в сыворотке крови у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких, сопровождающимся эозинофилией, а также у пациентов с диссеминированным вариантом туберкулезной инфекции без эозинофилии (табл. 2). Эотаксин – представитель СС-семейства хемокинов, впервые обнаруженный в бронхоальвеолярной жидкости аллергизированных морских свинок, основная роль которого заключается в потенцировании процессов ре-

циркуляции эозинофилов из кровотока в ткани, и наоборот [9]. Для эозинофилов человека определен высокий уровень экспрессии рецепторов к эотаксину (CCR3), активация которых *in vitro* опосредует хемотаксис и дегрануляцию изучаемых клеток [6, 7]. Наряду с выраженными хемотаксическими эффектами, доказанной на сегодняшний день является способность эотаксина усиливать мобилизацию эозинофилов из костного мозга, обуславливая избыток эозинофильных лейкоцитов в периферической крови [15]. Следует отметить, что однозначная интерпретация полученных нами данных представляется весьма затруднительной. По-видимому, одним из механизмов избыточного содержания данного хемокина в сыворотке крови при туберкулезе легких может быть опосредованное влияние иммунорегуляторных цитокинов, обуславливающих формирование иммунного ответа по гумо-

ральному типу (IL-4, IL-13 и др.), которые стимулируют экспрессию mRNA эотаксина в эпителиальных клетках, фибробластах кожи и эндотелиоцитах. На моделях *in vivo* было показано, что комплексное воздействие IL-4 с IL-5, TNF, β 2-интегринами и молекулами адгезии сосудов приводило к десятикратному увеличению содержания трех биохимических форм эотаксина [6]. В свою очередь, повышение содержания изучаемого хемокина в сыворотке крови у больных туберкулезом без эозинофилии, вероятно, может быть результатом формирования градиента данного хемокина между кровотоком и очагом инфильтрации с активным вовлечением механизмов адгезии и факторов, регулирующих выживание эозинофильных клеток для осуществления их активного хемотаксиса в зону гранулематозного воспаления. На сегодняшний день установлен факт секреции эотаксина и самими эозинофилами, избыточные концентрации которого активируют механизмы, обеспечивающие усиление процессов адгезии эозинофильных клеток к эндотелию сосудов и последующей их миграции в ткани [11, 15].

Таким образом, полученные нами результаты подтверждают реактивный характер эозинофилии, сопровождающей туберкулез легких, механизм формирования которой опосредован избыточной наработкой клетками крови эозинофилактивирующих медиаторов (преимущественно IL-5). Последний тезис подтверждается наличием положительной корреляционной зависимости между уровнями IL-5 в сыворотке крови у больных туберкулезом легких (инфильтративным и диссеминированным), ассоциированным с эозинофильной реакцией крови, и количеством эозинофильных гранулоцитов в периферической крови у этих пациентов ($r = 0,635$, $p < 0,05$ и $r = 0,779$, $p < 0,05$ соответственно). Резюмируя вышеизложенное можно заключить, что туберкулезная инфекция, сопровождающаяся эозинофилией, характеризуется дисбалансом секреции иммунорегуляторных цитокинов, поляризующих иммунный ответ в направлении Th2, а также принимающих участие в регуляции механизмов клеточного гомеостаза лейкоцитов эозинофильного ряда. Это создает условия для усиления напряженности как процессов дифференцировки эозинофилов периферической крови, опосредуя их миграцию в очаг гранулематозного воспаления, так и обратной рециркуляции эозинофильных клеток в кровотоки.

Список литературы

1. Воронкова О.В., Уразова О.И., Новицкий В.В., Стрелис А.К. Иммунопатология туберкулеза легких. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – 194 с.
2. Гергерт В.Я., Авербах М.М., Космиади Г.Г., Абрамова З.П., Хоменко И.С. Цитокины при туберкулезе // Вестник РАМН. – 1995. – № 7. – С. 33-38.
3. Литвинова Л.С., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Клеточные механизмы больших эозинофилий крови. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2007. – 138 с.
4. Мишин В.Ю., Чуканов В.И., Григорьев Ю.Г. Побочное действие противотуберкулезных препаратов при стандартных и индивидуализированных режимах химиотерапии. – М.: Компьютербург, 2004. – 205 с.
5. Мордвинов В.А., Фурман Д.П. Цитокины: биологические свойства и регуляция экспрессии гена интерлейкина-5 человека // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 53-67.
6. Fulkerson P.C., Fischetti C.A., Rothenberg M.E. Eosinophils and CCR3 regulate interleukin-13 transgene-induced pulmonary remodeling // Am. J. Pathol. – 2006. – Vol. 169 (6). – P. 2117-2126.
7. Garcia-Zepeda E.A., Rothenberg M.E., Ownbey R.T. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia / ed. Celestin J., Leder P., Luster A.D. // Nat. Med. – 1996. – Vol. 2. – P. 449-456.
8. Hogan S.P., Rosenberg H.F., Moqbel R. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease // Clinical & Experimental Allergy. – 2008. – Vol. 38. – P. 709-750.
9. Jose P.J., Griffiths-Johnson D.A., Collins P.D. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation / ed. Walsh D.T., Moqbel R., Totty N.F., Truong O., Hsuan J.J., Williams T.J. // J. Exp. Med. – 1994. – Vol. 179. – P. 881-887.
10. Kirman J., Zakaria Z.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.
11. Lacy P., Moqbel R. Eosinophil cytokines // Chem Immunol. – 2000. – Vol. 76. – P. 134-155.
12. Lasco T.M., Turner O.C., Cassone L. Rapid Accumulation of Eosinophils in Lung Lesions

in Guinea Pigs Infected with Mycobacterium tuberculosis // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72 (2). – P. 1147-1149.

13. Legrand F.A., Driss V., Woerly G. Functional $\gamma\delta$ TCR/CD3 Complex Distinct from $\gamma\delta$ T Cells Is Expressed by Human Eosinophils // PLoS ONE. – 2009. – Vol. 4, Issue 6. – e5926. www.plosone.org

14. 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.

15. Rothenberg M.E. Eotaxin // J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1999. – Vol. 21 (3). – P. 291-295.

поступила в редакцию 15.02.2011

отправлена на доработку 09.03.2011

принята к печати 14.03.2011