

# ПАТОГЕНЕЗ, ДИАГНОСТИКА И ИММУНОТЕРАПИЯ ИММУНОПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

## ИММУНОЛОГИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

### ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА И САРКОИДОЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Белокурлов М.А.<sup>1</sup>, Старшинова А.А.<sup>1</sup>, Журавлев В.Ю.<sup>1</sup>, Яблонский П.К.<sup>1,2</sup>, Павлова М.В.<sup>1</sup>, Кирюхина Л.Д.<sup>1</sup>, Сапожникова Н.В.<sup>1</sup>, Зайцев И.А.<sup>1</sup>, Володич О.С.<sup>1</sup>, Козак А.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Санкт-Петербургский Научно-Исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** В последние годы наблюдается неуклонный рост заболеваемости саркоидозом, с ежегодным увеличением числа больных на 1,9% [Жаднов В.З., 2001; Визель А.А., 2013; Jindal S.K., 2000], что связано с совершенствованием диагностики [Гармаш Ю.Ю., 2003; Mana J., 2001 Rubanik T.V., 2006]. Внедрение в диагностический комплекс новых иммунологических методов, может изменить подходы в дифференциальной диагностике саркоидоза и туберкулеза. Цель исследования: определение диагностической значимости иммунологических методов в дифференциальной диагностике саркоидоза и туберкулеза органов дыхания.

**Материалы и методы.** За период с 2013-2014гг. проведено когортное исследование на базе отделений дифференциальной диагностики и терапии туберкулеза легких. Обследовано 66 пациентов с диссеминированными изменениями в легких по данным рентгенологического обследования (28 (42,4%) мужчин и 38 (57,6%) женщин) в возрасте от 18 до 75 лет. Всем проведен комплекс диагностики с оценкой клинической симптоматики, исследованием респираторного материала на наличие МБТ с применением бактериологических и молекулярно-биологических методов. Всем пациентам проведена гистологическая верификация диагноза после забора биоптата из лимфатического узла или легочной ткани, который получен после проведения чрезбронхиальной биопсии или секторальной резекции. По результатам обследования 17 пациентов с гранулематозными заболеваниями нетуберкулезной природы и без саркоидоза были исключены из исследования, остальные 49 человек распределены на две группы: I группа с туберкулезом органов дыхания (n=32), II группа с саркоидозом органов дыхания II-III степени (n=17). Всем пациентам одновременно проведены иммунологи-

ческие тесты TB.SPOTa, QuantiFERON®-TB Gold, после постановка п. Манту с 2 ТЕ и Диаскинтест (ДСТ). Обработка материала проводилась с использованием программ SPSS 16.0. Применялся критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ . Проводился расчет показателей диагностической значимости: диагностической чувствительности (ДЧ), диагностической специфичности (ДС), диагностической информативности (ДИ), положительная прогностическая значимость результата (ППЗР), отрицательная прогностическая значимость результата (ОПЗР).

**Результаты.** По данным иммунологического обследования в группах положительные результаты тестов в одинаковом проценте случаев зафиксированы в I группе по TB.SPOT (78,2% (25)), QFT (71,9% (23)), ДСТ (81,3% (26)), пр. Манту с 2 ТЕ (84,4% (27)). Во II группе тесты имели отрицательный результат по TB.SPOT (82,3% (14)), QFT (88,2% (15)), ДСТ (94,1% (16)), пр. Манту с 2 ТЕ (35,3% (6)).

Полученные результаты позволили рассчитать показатели диагностической значимости тестов: TB.SPOT (ДЧ – 80,6%, ДС-87,5%, ДЭ-84,1%, ППЗП-92,6%, ПЗОР-70,0%); QFT (ДЧ – 74,2%, ДС-88,2%, ДЭ-81,2%, ПЗПР-92,0%, ПЗОР -65,2%); ДСТ (ДЧ – 81,3%, ДС-94,1%, ДЭ-87,7%, ПЗПР-96,3%, ПЗОР -72,7%); пр. Манту с 2ТЕ (ДЧ – 84,4%, ДС-40,0%, ДЭ-62,2%, ПЗПР -75,0%, ПЗНР -54,5%).

**Обсуждение и выводы:** полученные результаты свидетельствуют о высокой диагностической значимости TB.SPOTa и QuantiFERON®-TB Gold, более высокой информативности Диаскинтеста. При этом проба Манту с 2 ТЕ, которая входит в обязательный комплекс обследования, имеет низкие показатели информативности.

### ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФАГОЦИТОЗА МОНОЦИТОВ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ ПРИ ИНФИЛЬТРАТИВНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии»  
Минздрава России, Екатеринбург, Россия

**Введение.** Изучение нарушения механизмов резистентности у больных при инфицировании их лекарственно устойчивыми или лекарственно чувствительными изолятами *Mycobacterium tuberculosis* представляет для исследователей большой интерес. Некоторые ученые

отмечают отличие заболеваемости туберкулезом между мужчинами и женщинами, обусловленные, в том числе, различием уровня половых гормонов. Целью данной работы стало изучение функционально-метаболической активности моноцитов крови при инфильтративном туберкулезе легких, вызванном лекарственно устойчивыми и лекарственно чувствительными изолятами *Mycobacterium tuberculosis* у представителей обоего пола.

**Материалы и методы.** В работу включены результаты обследования 54 человек, из которых 29 находились на лечении в клинике Уральского НИИ фтизиопульмонологии с 2011 по 2013 годы, а 25 обследованных — практически здоровыми людьми, донорами крови. Всем больным был поставлен диагноз «инфильтративный туберкулез легких», распространенность процесса от 1 до 3 долей легкого, средний возраст составил 35,6 года. 42,2% больных являлись мужчинами, 57,8% — женщинами. Среди обследованных было 12 больных туберкулезом, вызванным лекарственно чувствительными изолятами (I группа) и 17 пациентов — вызванным лекарственно устойчивыми изолятами (II группа). Для оценки уровня экспрессии молекул адгезии (CD11b и CD11c) и HLA-Dg антигена на поверхности моноцитов использовалась цельная кровь с антикоагулянтом ЭДТА, для определения фагоцитарной активности клеток — с антикоагулянтом лития гепарином. Оценка поглотительной и метаболической способности моноцитов, экспрессии молекул адгезии и HLA-Dg антигена на поверхности клеток осуществлялась методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER®Epics®XL (Beckman Coulter, USA). Для оценки фагоцитарной активности моноцитов использовали набор реагентов Phagotest (Glycotope Biotechnology, Germany), в состав которого входили FITC-меченые опсонизированные бактерии *E. coli*. Для оценки метаболической способности гранулоцитов и моноцитов использовали набор Bursttest (Glycotope Biotechnology, Germany), устанавливали количество клеток, подвергшихся «окислительному взрыву». Статистическая обработка результатов проведена с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 и STATISTICA v.6.0.

**Основные результаты.** Изучение двух групп больных с различной лекарственной устойчивостью возбудителя, вызывавшего туберкулез легких, показало следующее. Максимальное число фагоцитирующих моноцитов наблюдалось у больных с лекарственно чувствительными изолятами *Mycobacterium tuberculosis*. Разница между показателями больных этой группы и показателями больных, у которых туберкулез был вызван изолятами *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя составила 23,7%. Доля моноцитов, продуцирующих активные формы кислорода, от общего числа этих клеток достоверно снижалась независимо от лекарственной чувствительности возбудителя по сравнению с группой доноров: на 21,8% и 17,2% в I и II группах больных. При туберкулезе, вызванном *Mycobacterium tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, абсолютное количество CD11b+моноцитов превышало этот показатель и в контрольной группе и в группе больных инфильтративным туберкулезом, вызванным лекарственно чувствительными изолятами *Mycobacterium tuberculosis* в 1,3 — 1,4 раза. Экспрессия молекулы CD11c на моноцитах подчинялась похожим закономерностям. Доля моноцитов, экспрессирующих молекулы главного комплекса гистосовместимости, была максимальной у пациентов с лекарственно

чувствительными изолятами *Mycobacterium tuberculosis* и составляла 36,8%. Изучение функционально-метаболических особенностей моноцитов крови у больных инфильтративным туберкулезом с учетом гендерных отличий показало следующее. В первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что у мужчин, независимо от лекарственной чувствительности возбудителя, наблюдалось резкое увеличение количества лейкоцитов и моноцитов: в сравнении с контролем оно было 1,5 — 2 кратным. У женщин выявлено снижение бактерицидного потенциала в сравнении с контролем на 14%, в то время как у мужчин он увеличивался в 1,7 раза, также у женщин отмечалось достоверное снижение числа фагоцитирующих клеток — разница с мужчинами в этом случае составляла 1,6 раза.

**Заключение.** Таким образом, инфильтративный туберкулез легких сопровождается количественными и функционально-метаболическими изменениями моноцитов крови. У мужчин с инфильтративным туберкулезом преобладал повышенный поглотительный потенциал, тогда как у женщин, напротив, отмечалось снижение популяции моноцитов с сохранной поглотительной функцией независимо от лекарственной устойчивости возбудителя.

#### ИЗУЧЕНИЕ ФАГОЦИТАРНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ РЕАКЦИЙ У БОЛЬНЫХ С ОТГРАНИЧЕННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗНЫМ СПЕЦИФИЧЕСКИМ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ ПРОЦЕССОМ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОФЛЮОРИМЕТРИИ

Бердогоина О.В., Ершова А.В.

ФГБУ «Уральский НИИ фтизиопульмонологии»  
Минздрава России, Екатеринбург, Россия

**Введение.** Процесс поглощения, переваривания и последующего представления антигена клеткам иммунной системы стадийный и зависит от большого количества факторов вне- и внутриклеточной кооперации. Кроме того, результат последующей реакции иммунной системы связан со значительным числом факторов, включая интегративные взаимодействия клеток. Целью данного исследования стало изучение поглотительной и функционально-метаболической активности фагоцитов, а также некоторых клеточных реакций с использованием метода проточной цитофлюориметрии у больных с отграниченным туберкулезным специфическим воспалительным процессом.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось с участием 25 человек. В первую группу было включено 15 больных с диагнозом туберкулез легкого, туберкулема (8 женщин, 7 мужчин, средний возраст — 31,8 года). Вторая группа (контрольная) состояла из 10 доноров крови, практически здоровых людей и была сопоставима с первой по возрасту и гендерному распределению. Поглотительная способность нейтрофилов и моноцитов оценивалась методом проточной цитофлюориметрии на приборе COULTER®Epics®XL (Beckman Coulter, USA) согласно инструкций, прилагаемых к наборам Phagotest® (Orpegen Pharma, BD Bioscience) и BurstTestKit — PhagoBurst (Glycotope Biotechnology, GmbH). Субпопуляции лимфоцитов изучались с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA). Подсчитывали общее количество Т-лимфоцитов (CD45+CD3+), число Т-цитотоксических клеток (CD45+CD3+CD8+), Т-хелперов (CD45+CD3+CD4+), Т-NK-клеток (CD45+CD3+CD16+56+), устанавливали количество В-

(CD45+CD19+) и NK-клеток (CD45+CD3-CD16+56+). Статистическая обработка результатов проведена с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft® Windows® 7 Professional, USA) и программы «STATISTICA» v.6.0 (StatSoft, USA).

**Основные результаты.** Выявлено снижение относительного количества моноцитов, способных к фагоцитозу в среднем на 17,7% ( $p < 0,0001$ ). У женщин эти изменения проявлялись в значительной мере и составляли 23,5%. Другим результатом нарушения метаболизма моноцитов стало снижение продукции супероксиданиона в ответ на стимуляцию *E. coli*. В сравнении с контрольной группой оно составляло 34,3%. Исследуя биологические образцы больных с туберкулемами, мы установили, что количество полиморфноядерных клеток было понижено на 21,4%. Необходимо отметить, что и в этом случае изменения были более выраженными в группе женщин, где этот показатель снижался на 33,0%. У мужчин с туберкулемами отличий в количестве клеток с контрольной группой не отмечалось. Изучение фагоцитарной активности нейтрофилов показало уменьшение числа активных клеток на 32,2%: у мужчин — на 15,4%, у женщины более значимо — в 1,9 раза. Выраженные отклонения наблюдались при изучении функционально-метаболического потенциала клеток. Резервные возможности продукции супероксиданиона, продуцируемого для разрушения патогена, были снижены у больных с туберкулемами на 36,2%, при этом у мужчин снижение составляло 21,2%, у женщин, также как и в ранее описанных случаях, было выражено значительно — в 2,0 раза. Изучение субпопуляций лимфоцитов выявило некоторые особенности. У обследованных больных было обнаружено снижение числа Т-лимфоцитов на 12,1%, наиболее характерное для мужчин, что приводило к неизбежному снижению всех исследованных субпопуляций Т-клеток. Абсолютное количество Т-хелперов уменьшалось на 7,5%, у мужчин даже значительно — на 20,6%. Количество Т-цитотоксических клеток составило  $0,57 \cdot 10^9$ /л, что было на 19,7% ниже, чем у доноров крови. Количество Т-NK-клеток также было меньше контрольных значений, изменения были обнаружены только в когорте женщин (в 2 раза в сравнении с донорами крови,  $p < 0,0001$ ). Изучая состав других популяций лимфоцитов, нами установлено, что и они имели сниженный количественный состав, чем у здоровых добровольцев. В частности, число В-лимфоцитов было понижено в среднем на 39,3%, у мужчин — на 32,1%, у женщин — в 1,8 раза. Такие изменения вполне объяснимы и связаны со уменьшением числа Т-хелперов (CD4+), которые вместе с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CD8+) сенсibilизируются, выделяя хемотоксины и цитокины, и при их сниженном количестве не вызывают значительного притока макрофагов, повышения их бактерицидной активности, а также не способствуют увеличению популяции В-лимфоцитов, как это должно происходить в условиях адекватной реакции иммунной системы. Сходные изменения были выявлены на популяции NK-клеток. Количество клеток также было понижено на 15,4% (у мужчин менее выражено — на 7,7%, у женщин — на 19,3%).

**Заключение.** Таким образом, изменения фагоцитарной активности клеток и основных показателей клеточного звена иммунной системы по данным исследования методом проточной цитофлюориметрии у пациентов с туберкулемами характеризуются значительным достоверным снижением количества фагоцитирующих клеток как ней-

трофилов, так и моноцитов (на 32–35%) с угнетением их метаболической активности (на 34–36%). Для пациенток эта динамика отличается большей выраженностью и составляет около половины от величины, наблюдающейся у здоровых добровольцев.

## ЗНАЧЕНИЕ КВАНТИФЕРОНОВОГО ТЕСТА И IP-10 В ДИАГНОСТИКЕ ТУБЕРКУЛЕЗА У ПАЦИЕНТОВ С ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ

Васильева Е.В.<sup>1</sup>, Пантелеев А.М.<sup>2</sup>, Вербов В.Н.<sup>1</sup>, Тотолян А.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ГБУЗ «Городская туберкулезная больница № 2», Санкт-Петербург, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Согласно оценкам ВОЗ, 13% из 9 миллионов человек, заболевших туберкулезом (ТБ) в 2013 г., были ВИЧ-положительными. Высокая частота выявления туберкулеза у больных ВИЧ-инфекцией обусловлена невозможностью его установить при скрининговом обследовании из-за нетипичного течения и отсутствия изменений по данным лучевого обследования, что обусловлено состоянием тяжелого иммунодефицита.

Традиционно скрининг латентной туберкулезной инфекции (ЛТБИ) проводится с применением пробы Манту, при этом установленным фактом является нарастание частоты ложноотрицательных результатов у пациентов с глубокой иммуносупрессией, что снижает эффективность данного метода в максимально уязвимой группе ВИЧ-инфицированных пациентов.

На сегодняшний день в литературе, наряду с определением антиген-индуцированной продукции IFN $\gamma$  в тесте “QuantiFERON-TB Gold In-Tube” (КФТ), встречаются данные о высокой диагностической значимости выявления ЛТБИ у пациентов с выраженной иммуносупрессией при определении IP-10 (IFN $\gamma$  индуцируемый протеин-10), который принадлежит к семейству СХС-хемокинов и продуцируется моноцитами/макрофагами, фибробластами и эндотелиальными клетками.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение сравнительной ценности квантиферонового теста и IP-10 в диагностике туберкулезного инфицирования у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

**Материалы и методы исследования.** В исследование были включены больные ВИЧ-инфекцией и впервые выявленным активным туберкулезом органов дыхания ( $n=40$ ), подтвержденным ростом *Mtb* на питательных средах. Группу сравнения ( $n=47$ ) составили пациенты с ВИЧ-инфекцией, у которых по результатам скрининга не было выявлено признаков активного туберкулеза.

Всем лицам, включенным в исследование ( $n=87$ ), был выполнен КФТ и у 89% определено содержание антиген-индуцированной (AG) и спонтанной продукции (NIL) IP-10. Содержание IP-10 определяли иммуноферментным методом с использованием набора реагентов Bender Medsystems (Вена, Австрия). Постановку КФТ проводили строго согласно инструкции. Результаты оценивали с помощью программного обеспечения QFT 2.62, предоставленного производителем.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, SPSS (версия 13.0), Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.), стандартных ме-

тодов непараметрической статистики, построения ROC-кривых и других методов.

**Результаты и обсуждение.** Положительные результаты КФТ и IP-10AG-NIL наблюдались: в группе больных ВИЧ-инфекцией и ТБ у 28 из 40 обследованных и у 26 из 39, соответственно. В группе пациентов с ВИЧ-инфекцией без ТБ у 13 из 47 обследованных и у 3 из 38, соответственно.

Для сравнения информативности определения IP-10AG-NIL и КФТ были проанализированы характеристические ROC – кривые и рассчитаны основные диагностические показатели: чувствительность и специфичность. Проведенный анализ показал, что КФТ уступает тесту с IP-10 по ППК (0,78 (ДИ 0,67-0,88) против 0,81 (0,71-0,91). При использовании выбранного нами ранее порогового значения 1087 пг/мл для IP-10, достигалась чувствительность выявления туберкулезного инфицирования 67 % (ДИ 50-81) и специфичность 92% (ДИ 79-98), в то время как КФТ имел сопоставимую чувствительность 70% (ДИ 54-83), но значимо более низкую специфичность 73% (ДИ 57-84) ( $p=0,021$ , критерий хи-квадрат). При этом применение IP-10 обеспечивало больший диапазон измеряемых концентраций по сравнению с IFN $\gamma$  и более высокое пороговое значение 1087 пг/мл против 36 пг/мл (14 пг/мл (0,35 МЕ/мл) для IFN $\gamma$ , что является его несомненным преимуществом.

**Выводы.** В целом, полученные результаты показали возможность использования IP-10 в качестве альтернативного биомаркера IFN $\gamma$  для выявления туберкулезного инфицирования у пациентов с ВИЧ-инфекцией.

#### **ПРОТЕКТИВНАЯ СПОСОБНОСТЬ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ, СОДЕРЖАЩЕЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК ТВ10.4 В ЭКСПРЕССИОННОЙ СИСТЕМЕ КЛЕТОК E.COLI, ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ**

Витовская М.Л.<sup>1</sup>, Виноградова Т.И.<sup>1</sup>, Заболотных Н.В.<sup>1</sup>, Добровольская О.А.<sup>2</sup>, Федорова Е.А.<sup>2</sup>, Черняева Е.К.<sup>2</sup>, Духовлинов И.В.<sup>2</sup>, Симбирцев А.С.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия

В современных условиях стремительного распространения множественной и широкой лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза (МБТ), высокой стоимости новых лекарственных препаратов и недостаточной эффективности вакцины БЦЖ, одним из приоритетных направлений борьбы с туберкулезом является разработка новой вакцины, обеспечивающей эффективную специфическую профилактику этого заболевания.

**Цель работы:** оценить протективные свойства нового вакцинного кандидата, содержащего рекомбинантный микобактериальный белок ТВ10.4 в экспрессионной системе клеток E.coli.

**Материал и методы.** Сконструирована кандидатная вакцина, содержащая микобактериальный белок ТВ10.4, экспрессирующийся в клетках E.coli. Ее протективные свойства изучены на белых беспородных мышах при двукратной иммунизации с интервалом две недели и последующим (через две недели) заражением M. tuberculosis Erdman. Эффективность вакцинации оценивали через 4,5 и 7 недель после инфицирования по регистрации биометрических показателей внутренних органов, поражен-

ности легких специфическим процессом, высеваемости МБТ из легких (КОЕ МБТ), морфологической оценке срезов легких зараженных животных, а также анализа фагоцитарной функции перитонеальных макрофагов (пМф).

**Результаты.** При оценке протективного действия иммунизации вакцинным кандидатом у мышей обнаружена отчетливая задержка развития экспериментального туберкулеза. Эффект кандидата как на промежуточном, так и заключительном этапе эксперимента, при сравнении с невакцинированными инфицированными мышами зарегистрирован по достоверному снижению коэффициентов массы легких и селезенки ( $p<0,02$ ), индексов поражения легких ( $p<0,001$ ), а также значимо меньшему бактериовыделению (индекс защиты легких +1,25 и +1,56 lg КОЕ МБТ соответственно срокам наблюдения). При морфологическом исследовании легких иммунизированных кандидатом животных отмечена значительная задержка распространенности поражения, отсутствия альтеративного компонента специфического воспаления, более выраженные периваскулярные и перибронхиальные лимфогистиоцитарные инфильтраты, указывающие на активацию местного иммунитета легочной ткани. Иммунизация вакцинным кандидатом способствовала сохранению всех параметров фагоцитоза пМф на уровне интактных животных, тогда как у невакцинированных мышей фагоцитарные реакции были достоверно подавлены, что характерно для распространенного туберкулезного процесса.

Результативность иммунизации изученным кандидатом, содержащим микобактериальный белок ТВ10.4, достоверно превосходила и действие вакцины БЦЖ по показателям пораженности легких специфическим процессом ( $p<0,001$ ) и по интегральному показателю тяжести течения инфекции – высеваемости МБТ из легких: индексы защиты при иммунизации кандидатной вакциной были выше на 0,70 и 0,72 lg КОЕ МБТ соответственно срокам наблюдения. Гистологическое изучение срезов легочной ткани при сравнении с действием стандартной вакцины показало значительно большую ее воздушность, меньшее количество гранул и более выраженную местную иммунную реакцию легких за счет числа перибронхиальных лимфогистиоцитарных инфильтратов. Переваривающая способность пМф мышей, иммунизированных вакцинным кандидатом, значимо превышала ( $p<0,01$ ) показатели животных, вакцинированных БЦЖ.

Таким образом, на модели туберкулезной инфекции у мышей установлен высокий протективный потенциал вакцинного кандидата, содержащего микобактериальный белок ТВ10.4 в экспрессионной системе E.coli, который предлагается для углубленной доклинической оценки в качестве перспективного средства специфической профилактики туберкулеза.

#### **СООТНОШЕНИЕ АКТИВНОСТИ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ И ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ**

Дьякова М.Е., Титаренко О.Т., Эсмедляева Д.С.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Аденозиндезаминаза (АДА), рассматриваемая в качестве маркера напряженности иммунного отве-

та, является лигандом мембранной и растворимой формы CD 26 – эктопептидазы, играющей важную роль в активации Т-клеток. Образование комплекса CD26 с АДА-1 на мембране Т-лимфоцитов индуцирует костимуляторный эффект в активации Т-клеток, что приводит к усилению продукции Th1 и провоспалительных цитокинов.

**Цель** – изучить взаимосвязь активности АДА, CD26 с продукцией цитокинов у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ).

**Материалы и методы.** У 29 больных ФКТ исследовали в сыворотке и мононуклеарах (Мн) крови концентрацию CD 26, активность АДА и ее изоферментов (АДА-1 и АДА-2), концентрацию цитокинов (IL-10, IL-17, IL-18), IFN- $\gamma$ , FNO- $\alpha$  в крови, индуцированных PPD.

**Результаты.** Установлен по сравнению с референтными значениями в сыворотке крови значимый рост общей активности АДА ( $19,3 \pm 1,6$  ед/л), АДА-2 ( $16,6 \pm 1,4$  ед/л), %АДА-2 ( $85,7 \pm 2,2\%$ ), наряду со значимым снижением активности АДА-1 ( $2,7 \pm 0,5$  ед/л) и процентного ее содержания в общей активности АДА ( $14,3 \pm 2,2\%$ ). Уровень CD26 идентичен референтному ( $539,7 \pm 75,1$  нг/мл). В мононуклеарах активность АДА-2, %АДА-1 и %АДА-2 регистрировались в пределах референтных значений ( $0,71 \pm 0,16$  ед/106 клеток;  $66,2 \pm 6,0\%$ ;  $33,8 \pm 6,0\%$  соответственно), а активность АДА и АДА-1 значимо снижена ( $1,67 \pm 0,22$  ед/106 клеток и  $0,97 \pm 0,15$  ед/106 клеток соответственно), также как и уровень CD26 ( $6,35 \pm 2,1$  нг/106 клеток).

Интенсивность секреции цитокинов, индуцированных специфическим антигеном PPD, была разнонаправленной: значимый рост IFN- $\gamma$  ( $342,7 \pm 76,5$  пг/мл) и IL-18 ( $115,0 \pm 13,3$  пг/мл), наряду со снижением уровней FNO- $\alpha$  ( $356,3 \pm 82,9$  пг/мл) и IL-10 ( $40,4 \pm 10,6$  пг/мл). При этом уровень секреции IL-17 не отличался от референтного ( $5,3 \pm 2,5$  пг/мл).

Выявлена ассоциированность показателей пуринового метаболизма с продукцией цитокинов: прямая зависимость между активностью АДА-1 сыворотки крови и продукцией FNO- $\alpha$ \_PPD ( $r=0,62$ ,  $p=0,04$ ), между %АДА-1мн и IL-18\_PPD ( $r=0,63$ ,  $p=0,05$ ) и обратная корреляция между IFN- $\gamma$ \_PPD и CD26 ( $r=-0,61$ ,  $p=0,048$ ). Тесная прямая связь свойственна провоспалительным цитокинам: IFN- $\gamma$ \_PPD и FNO- $\alpha$ \_PPD ( $r=0,67$ ;  $p=0,05$ ), IFN- $\gamma$ \_PPD и IL-17\_PPD ( $r=0,7$ ;  $p=0,05$ ).

**Заключение.** Выявленные корреляционные связи между активностью АДА и продукцией цитокинов отражают важную роль АДА в Th1 ответе. Снижение активности АДА-1 приводит к росту аденозина, который регулирует продукцию провоспалительных цитокинов. Низкий уровень CD26 и отсутствие связи между АДА и CD26 характерны для больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких и ассоциируются с разнонаправленными изменениями продукции провоспалительных цитокинов.

## РОЛЬ NF-KB В РАЗВИТИИ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Евстифеев В.В., Шепелькова Г.С., Бочарова И.В., Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва, Россия

Исследования последних двух десятилетий показали ключевую роль транскрипционного фактора NF-kB в регуляции процессов острого и хронического воспаления. Нарушение активации NF-kB приводит к несбалансированному воспалительному ответу, что имеет тяжелые по-

следствия при самых разных заболеваниях. Селективное ингибирование классического пути активации NF-kB за счет блока  $\gamma$ -субъединицы комплекса IKK (NEMO) пептидом NBD, приводит к подавлению хронического воспаления *in vivo*. Пептид NBD – это искусственно синтезированный фрагмент  $\beta$ -субъединицы IKK-комплекса, который отвечает за взаимодействие с NEMO. NBD предотвращает образование IKK-комплекса. Поскольку при туберкулезе (ТБ) основным механизмом патогенеза является хроническое воспаление, мы решили изучить влияние селективной супрессии NF-kB на развитие экспериментальной инфекции у мышей генетически чувствительных к ТБ.

Мышей I/St аэрозольно инфицировали вирулентным штаммом *M. tuberculosis*. В течение третьей недели после заражения мышам подопытной группы аэрозольно, вводили NBD-пептид, а мышам контрольных групп – контрольный пептид (NBD-пептид у которого два ключевых триптофана заменены на аланин) и раствор 0,9M NaCl по аналогичной схеме. Для доставки пептидов в цитоплазму эти пептиды синтезировали совместно с последовательностью пептида antennapedia из *Drosophilla melanogaster*, способного проникать через клеточную мембрану. На 32 день после инфицирования исследовали степень поражения легочной ткани и рост микобактерий в легком.

Селективный блок «классического» пути активации транскрипционного фактора NF-kB у чувствительных к ТБ мышей I/St привел к возникновению выраженных различий в гистологической картине воспаления ткани легких между группами сравнения. В группе с NBD-пептидом участки воспаления были небольшого размера и хорошо отграничены от окружающей легочной ткани, а степень инфильтрации значительно ниже, чем в контрольных группах. При этом, блокирование NF-kB в легочной ткани никак не влияло на количество микобактерий в легких чувствительных к ТБ мышей. Результаты анализа клеточного состава легких соответствовали данным гистологии: введение пептида NBD приводило к уменьшению инфильтрации легкого Т-клетками CD4+, CD8+ и нейтрофилами. Блок активации NF-kB с помощью пептида NBD приводит к снижению уровня экспрессии воспалительных факторов IL-6, Mir-1 $\alpha$  и TNF- $\alpha$ .

Таким образом, селективное ингибирование «классического» пути активации транскрипционного фактора NF-kB при ТБ приводит к снижению степени инфильтрации, и уровня воспаления в легочной ткани.

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕФИЦИТА САПОЗИНА D НА ТЕЧЕНИЕ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Еремеев В.В.<sup>1</sup>, Евстифеев В.В.<sup>1</sup>, Поспелов А.Л.<sup>1</sup>, Орлова С.Ю.<sup>1</sup>, Kaufmann S.H.E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ЦНИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Институт Инфекционной Биологии Макса Планка, Берлин, ФРГ

**Введение.** Сапозины (англ. sphingolipid activator proteins) представляют собой небольшие (8-11 kDa), кислые, термостабильные, не обладающие ферментативной активностью гликопротеины, участвующие в качестве кофакторов в процессах деградации гликофинголипидов с короткими олигосахаридными головными группами. Четыре сапозина (А, В, С и D) образуются в поздних эндосомах и лизосомах в результате протеолитического

расщепления единого белка-предшественника – про-сапозина. Сапозины опосредуют взаимодействие между водорастворимым ферментом и связанным с мембраной липидным субстратом, либо непосредственно активируют фермент.

**Цель и задачи.** Целью предлагаемого исследования является изучение роли сапозина D в формировании врожденного противотуберкулезного иммунитета. Конкретные задачи: 1) изучить влияние дефицита сапозина на антимикобактериальную активность макрофагов *in vitro*; 2) исследовать возможность компенсации дефицита сапозина посредством добавления экзогенного сапозина в культуру; 3) определить влияние дефицита сапозина D на течение туберкулеза *in vivo*.

**Материалы и методы.** Уровень антимикобактериальной активности легочных макрофагов оценивался по включению меченого тритием урацила микобактерией. Аэрозольное заражение мышей вирулентным лабораторным штаммом *Mtb H37Rv* использовали для сравнения чувствительности к туберкулезу мышей *Sap D KO* (бэккросс 10) и мышей дикого типа - *C57BL/6*. Критериями сравнения были высеваемость микобактерий из органов зараженных животных (легкие, селезенка) и средний срок выживания мышей после заражения.

**Основные результаты.** Во-первых, методом окраски специфическими антителами было показано, что экзогенно добавленный сапозин D способен проникать в макрофаги *in vitro*. Во-вторых, проведенные нами эксперименты показали, что инфицированные в культуре *in vitro* макрофаги костномозгового происхождения (МФКП), полученные от нокаутированных по гену про-сапозина мышей (*pSap-/-*), гораздо слабее подавляют рост *Mtb* по сравнению с макрофагами мышей дикого типа. Этот дефект полностью компенсировался добавлением в систему *in vitro* очищенного рекомбинантного человеческого сапозина D, но не других сапозина. Более того, обработанные *Sap-D* мутантные макрофаги *pSap-/-* подавляли метаболизм микобактерий даже более эффективно, чем макрофаги мышей дикого типа. При этом не выявлено существенных различий в антимикобактериальной активности *in vitro* между костномозговыми макрофагами от нормальных и дефицитных по гену сапозина D мышей. Показано, что по результатам определения высеваемости микобактерий из органов зараженных животных и динамики гибели мышей после заражения дефицитные по гену сапозина D мыши существенно более чувствительны к туберкулезу по сравнению с контролем дикого типа.

**Заключение.** Таким образом установлено, что сапозин D играет ключевую роль в защите хозяина от туберкулезной инфекции. Расшифровка механизма воздействия *Sap-D* на микобактерии позволит понять химические основы биологической активности сапозина и создаст предпосылки для разработки противотуберкулезных препаратов нового типа.

#### ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ TH17- И TREG-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Захарова П.А., Кононова Т.Е., Уразова О.И., Новицкий В.В., Чурина Е.Г.

ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, Томск, Россия

**Введение.** С открытием Th17-лимфоцитов активно исследуется их участие в развитии иммунного ответа про-

тив внутриклеточных патогенов. В том числе установлена протективная роль этих клеток против *M. tuberculosis* [Chen X. et al., 2010; Khader S.A. et al., 2010]. Интересно, что другая субпопуляция CD4+ T-лимфоцитов – регуляторные T-клетки (Treg), имеющие общий путь дифференцировки с Th17-лимфоцитами, обладают противоположным эффектом, а их гиперфункция сопровождается ослаблением противотуберкулезной защиты организма [Чурина Е.Г. и соавт., 2011]. Основными индукторами дифференцировки Th17- и Treg-лимфоцитов являются транскрипционные факторы RORC2 и FoxP3, соответственно. Исследование факторов, определяющих развитие Th0 по пути Th17, участвующих в реализации противоифекционного иммунитета, либо по пути Treg, опосредующих супрессию иммунного ответа, играет важную роль в понимании иммунопатогенеза туберкулеза легких, его прогнозе и оптимизации терапии.

**Цель:** исследовать экспрессию генов транскрипционных факторов Th17- и Treg-лимфоцитов при туберкулезе легких.

#### Задачи

1. Определить количество и функциональную активность (секрецию IL-17A и TGFβ) Th17- и Treg-лимфоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких.

2. Определить уровень мРНК генов транскрипционных факторов RORC2 и Foxp3 в лимфоцитах у больных туберкулезом легких.

3. Провести сравнительную оценку полученных результатов у больных туберкулезом легких в зависимости от клинической формы и варианта заболевания.

**Материал и методы.** В программу исследования вошли 67 пациентов с впервые выявленным туберкулезом легких (ТЛ) в возрасте от 20 до 55 лет. Все пациенты были разделены на группы в зависимости от клинической формы (инфильтративный, диссеминированный) и варианта (лекарственно-чувствительный (ЛЧ) и лекарственно-устойчивый (ЛУ)) заболевания. Группу сравнения составили 25 здоровых доноров. Материалом для исследования служила венозная кровь. Мононуклеарные лейкоциты выделяли из крови методом градиентного центрифугирования ( $\rho=1,077$  г/см<sup>3</sup>). Определение иммунофенотипа CD4+CD161+IL-17A+ Th17-лимфоцитов и CD4+CD25+FoxP3+ Treg проводили методом проточной цитометрии, согласно протоколу фирмы производителя («BD», США). Тотальную РНК из мононуклеарных лейкоцитов выделяли сорбентно-колоночным методом («QIAGEN», США). Экспрессию генов foxp3 и rorc2 определяли методом ПЦР в режиме реального времени. Содержание IL-17A и TGFβ в супернатантах культуральных суспензий определяли с помощью твердофазного иммуноферментного «сэндвичевого» метода (ELISA) согласно инструкциям производителя тест-систем («R&D Systems», США). Статистический анализ осуществлялся с помощью пакета прикладных программ «Statistica for Windows» Version 6.0 («StatSoft Inc.», США, 2003).

**Основные результаты.** В ходе проведенного исследования в лимфоцитах у пациентов с инфильтративным ЛЧ и ЛУ ТЛ и диссеминированным ЛЧ ТЛ выявлено увеличение уровня мРНК гена транскрипционного фактора RORC2 приблизительно в 2 раза ( $p<0,05$ ) по сравнению с группой здоровых доноров. Исключение составили больные с диссеминированным ЛУ ТЛ, у которых экспрессия гена rorc2 не отличалась от нормы. Вместе с тем, лишь у этой группы пациентов установлено увеличение

уровня мРНК гена транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах ( $p < 0,05$ ). При оценке содержания Th17-лимфоцитов в крови у пациентов с ТЛ выявлено повышение их абсолютного и относительного количества в среднем в 2,4 раза ( $p < 0,05$ ), за исключением группы больных с диссеминированным ЛУ ТЛ. При исследовании количества Treg-лимфоцитов в крови, увеличение было выявлено лишь у пациентов с диссеминированным ЛУ ТЛ (в 2,4 раза,  $p < 0,05$ ). Во всех группах пациентов с ТЛ была обнаружена повышенная концентрация IL-17A ( $p < 0,05$ ). Секретция TGF $\beta$  мононуклеарными лейкоцитами крови была увеличенной в 1,8 раза ( $p < 0,05$ ) лишь у пациентов с диссеминированным ЛУ ТЛ.

**Заключение.** При инфильтративном ЛЧ и ЛУ ТЛ и диссеминированном ЛЧ ТЛ отмечается увеличение экспрессии гена транскрипционного фактора RORC2 в лимфоцитах, количества Th17-клеток и гиперсекреция IL-17A, что, возможно, компенсирует нарушения Th1-звена иммунного ответа. Увеличение числа Treg-лимфоцитов в крови, повышение экспрессии гена транскрипционного фактора FoxP3 в лимфоцитах и гиперсекреция TGF $\beta$  у пациентов с диссеминированным ЛУ ТЛ, по-видимому, опосредуют реализацию иммуносупрессорных реакций и более тяжелое течение заболевания.

#### ПРИМЕНЕНИЕ QUANTIFERON®-TB GOLD, TB.SPOT ТЕСТА И ДИАСКИНТЕСТА В ВЫЯВЛЕНИИ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ СРЕДИ КОНТАКТНЫХ ЛИЦ

Истомина Е.В., Старшинова А.А., Журавлев В.Ю., Сапожникова Н.В., Чернохаева И.В., Беляева Е.Н., Павлова М.В.

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** По данным ВОЗ высокий риск развития туберкулезной инфекции имеют лица с латентной туберкулезной инфекцией (20%). К особой группе риска относятся контактные лица, работающие в противотуберкулезных учреждениях (ПТУ). Ранее выявление туберкулезной инфекции у работников ПТУ имеет особую актуальность. Цель исследования: определить информативность иммунологических тестов (Quantiferon®-TB Gold (QFT), TB.SPOT тест, Диаскинтест) в диагностике латентной туберкулезной инфекции среди контактных лиц.

**Материалы и методы:** За период с 2013-2014гг. проведено проспективное исследование на базе ФГБУ «СПбНИИФ» Минздрава России, в котором обследовано 60 человек: I группа (n=37) – здоровые лица, II группа (n=23) – сотрудники противотуберкулезного учреждения, имеющие прямой контакт с больными туберкулезом. Комплекс диагностики включал: рентгенологическое бактериологическое и иммунологическое обследование (пр. Манту с 2 ТЕ, Диаскинтест (ДСТ) QuantiFERON®-TB Gold (QFT) TB.SPOT). Обработка материала проводилась с использованием программы Statistica 6.0. Применялся критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты:** в I и II группах положительная пр. Манту с 2 ТЕ определялась в одинаково часто (89,2% (33) и 91,3% (21) соответственно. Полученные данные не имеют достоверных различий. Положительные результаты

по TB.SPOT имели достоверные различия с превалирование во II группе (69,6% (16) против 8,1% (3),  $p < 0,01$ , также как по QFT (10,8% (4) против 30,4% (7),  $p < 0,05$ . Данные тестов in vitro сопоставимы с результатами тестов in vivo (Диаскинтеста) в 10,8% (4) против 34,8% (8),  $p < 0,05$ . Диагностическая специфичность тестов составила: TB.SPOT – 94,4%, QFT – 88,9%, ДСТ – 88,9% и пр. Манту с 2 ТЕ – 8,3%.

**Выводы:** проба Манту 2ТЕ обладает низкой информативностью при выявлении латентной туберкулезной инфекции у лиц, находящихся в контакте с больными туберкулезом. Наряду с высокой информативностью всех иммунологических тестов, наиболее значимым является TB.SPOT, который среди контактных лиц, позволяет выявить ЛТИ в 47,8% случаев, тогда как Диаскинтест – в 34,8% и QFT – в 30,4% случаев.

#### ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК НА ОТВЕТ Т-КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Капина М.А., Рубакова Э.И., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С

ФГБНУ «ЦНИИТ» Москва, Россия

Основными факторами защитного иммунного ответа при туберкулезе считаются Т-лимфоциты CD4+, вырабатывающие IFN- $\gamma$ , и интерстициальные легочные макрофаги, активированные этим цитокином. На эту основную линию ответа влияет множество других компонентов иммунной системы. В частности, регуляторные дендритные клетки (DCreg) могут ингибировать ответ Т-клеток, и мы исследовали этот тип межклеточных взаимодействий в экспериментах на инбредных мышах.

DCreg получали из высоко очищенных клеток костного мозга Lin<sup>-</sup> после 6-дневного совместного культивирования с клетками стромы легкого (Kapina et al., 2013). Сначала было установлено, что добавление DCreg, выращенных на легочной строме, к пролиферирующим Т-клеткам приводит к угнетению этого ответа. Затем было показано, что DCreg резистентных к туберкулезу мышей C57BL/6 подавляли пролиферативный ответ Т-клеток значительно сильнее, чем такие же клетки чувствительных к инфекции мышей линии I/St. DCreg вырабатывали ингибирующие иммунный ответ факторы IL-10, TGF $\beta$  и простагландин E2, причем DCreg, полученные на строме от зараженных туберкулезом резистентных животных, вырабатывали больше IL-10 и TGF $\beta$ , чем аналогичные клетки чувствительных мышей. Ранее введение DCreg зараженным мышам I/St (3 недели после заражения) достоверно снижало количество микобактерий в легких, но этот терапевтический эффект не наблюдался, если клетки позднее (недели 5 или 8).

При оценке другой популяции регуляторных клеток, классических Treg с фенотипом CD4+CD25+Foxp3+, оказалось, что количество Treg в лимфатических узлах резистентных мышей значительно выше по сравнению с чувствительными, как до, так и после заражения. По мере прогрессии туберкулезной инфекции количество Treg оставалось постоянно низким у чувствительных животных, тогда как у резистентных наблюдалось их 2-х кратное увеличение. Напротив, популяция активированных эффекторных клеток CD4+CD25+Foxp3- была более многочисленной у чувствительных мышей I/St.

Параллельно было установлено, что клетки стромы легкого индуцируют образование не только DC<sub>Steg</sub> из костно-мозговых предшественников, но и классических Treg из лимфоидных клеток зараженных мышей после совместного культивирования в течение 6 дней. Treg резистентных животных ингибировали ответ антиген-специфических эффекторных Т-клеток эффективнее, чем аналогичные клетки чувствительных животных.

Таким образом, неблагоприятное течение инфекции у генетически чувствительных животных сопровождается отсутствием эффективного контроля иммунного ответа со стороны регуляторных клеток. Избыточный ответ приводит к неконтролируемому воспалению и нарушению функции легких, т. е. может считаться одним из факторов патогенеза туберкулезной инфекции.

### ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ДЕТЕЙ С ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ

Корнева Н.В., Старшинова А.А., Овчинникова Ю.Э., Ананьев С.М., Ватутина В.В., Якунова О.А., Довгалюк И.Ф.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Особенности развития туберкулезной инфекции определяются, в основном, состоянием иммунитета, преимущественно клеточного, реактивность которого в значительной мере определяет тяжесть, течение и исход туберкулезного процесса.

**Цель.** Сравнение показателей иммунного ответа у детей с туберкулезом органов дыхания и генерализованным туберкулезом.

**Материал и методы.** В клинике ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава РФ (отделение детской фтизиатрии и хирургии костно-суставного туберкулеза у детей и подростков) в период 2012-2015 гг. обследованы 143 пациента в возрасте от 3 до 14 лет с различными проявлениями туберкулезной инфекции. Диагностический комплекс: клинические, иммунологические (п. Манту 2ТЕ, Диаскинтест (ДСТ), QuantiFERON®-TB Gold (КФ), бактериологические, гистологические и лучевые методы (мультирезонансная компьютерная томография). На основании результатов обследования все дети были разделены на 3 группы: I-я группа (29) – дети с генерализованным туберкулезом, II-я группа (114) – дети с туберкулезом органов дыхания. Пациенты в группах были сходны по полу и возрасту. Иммунологический комплекс включал: определение циркулирующих противотуберкулезных антител [ПТАТ] проводилось по реакции пассивного гемолиза (РПГ), потребления комплемента (РПК), иммунофлюоресцентного анализа (ИФА); оценка субпопуляционного состава лимфоцитов (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD20+, CD25+, CD95+, HLA-DR+), фагоцитарной активности нейтрофилов (индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ)). Обработка материала проводилась с использованием программ Microsoft Office Word Excel 2010 и GraphPad Prism 6. Применялся критерий хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Количественные данные представлены в виде  $M \pm SD$ . Различия считались значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** В исследовании представлен анализ результатов Диаскинтеста, QuantiFERON®-TB Gold, ти-

тров противотуберкулезных антител в комплексе серологических реакций, сравнение субпопуляционного состава лимфоцитов и фагоцитарной функции нейтрофилов у детей туберкулезом органов дыхания и генерализованным туберкулезом. Результаты ДСТ и КФ были сопоставимы: в I группе преобладали отрицательные результаты ДСТ – 56,3% (17) и КФ – 58,6% (16), в то время как во II группе результаты ДСТ и КФ были преимущественно положительными – 88,4% (99) и 82,1% (92) соответственно. Анализ титров специфических антител показал, что у пациентов обеих групп титры были выше диагностических значений. У пациентов I-й группы уровень антител был выше, чем во II-й группе по данным РПК и ИФА. Статистически значимые различия (непарный t-критерий) установлены только по результатам ИФА ( $0,656 \pm 0,29$  (I группа) против  $0,273 \pm 0,06$  (II группа),  $p = 0,045$ ).

Также в I группе отмечено достоверное повышение CD3+ ( $67,0 \pm 1,53\%$  против  $58,1 \pm 1,08\%$ ;  $p = 0,0003$ ), CD19+ ( $20,88 \pm 1,76\%$  против  $16,69 \pm 0,44\%$ ;  $p = 0,001$ ), во II – достоверно выше уровень CD16+ ( $16,05 \pm 0,47\%$  против  $9,4 \pm 0,7\%$ ;  $p = 0,0001$ ) и CD25+ ( $13,27 \pm 0,58\%$  против  $6,72 \pm 0,59\%$ ;  $p = 0,0001$ ). При сравнении фагоцитарной функции нейтрофилов отмечено, что фагоцитоз имел не завершенный характер в обеих группах (ИЗФ  $0,97 \pm 0,03$  (I),  $0,99 \pm 0,06$  (II)).

**Выводы.** У детей с генерализованным туберкулезом выявлены особенности как клеточного, так и гуморального звена иммунного ответа. Высокий удельный вес отрицательных результатов ДСТ и КФ требуют дальнейшего изучения.

### ГЕН H2-AВ1 КОНТРОЛИРУЕТ ВОСПРИИМЧИВОСТЬ МЫШЕЙ К MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Логунова Н.Н., Польшаков В.И., Коротецкая М.В., Апт А.С.

ФГБНУ Центральный НИИ туберкулеза, Москва, Россия

Контроль восприимчивости хозяина к туберкулезной инфекции (ТБ) и тяжести ее течения осуществляется многими взаимодействующими генами. Ранее нами были выявлены три локуса (QTL) на хромосомах 3 (tbs1), 9 (tbs2) и 17 (tbs3), принимающих участие в контроле ТБ. В данной работе для идентификации гена-кандидата в локусе tbs3, расположенном в области главного комплекса гистосовместимости H2, были выведены новые конгенные линии мышей, отличающиеся по участкам генома в исследуемом локусе, перенесенном за счет рекомбинации от генетически чувствительной линии I/St (j-гаплотип) на резистентную основу B6 (b-гаплотип). Была исследована геномная область 8,4-65,0 Мб на 17-й хромосоме и при анализе фенотипов разных рекомбинантов искомым интервал был сужен до размера ~0,6 Мб. Клонирование 36 генов в этой области выявило наличие большого числа полиморфных генов, причем многие из них имеют важные иммунологические и регуляторные функции. У двух рекомбинантных линий мышей точки рекомбинации прошли в одном и том же гене H2-Aβ 1 (бета-цепь H2 второго класса H2-A гетеродимера), что привело к различиям в полиморфном районе. Эти две линии мышей имеют разную чувствительность к ТБ по таким фенотипам как среднее время выживания и количество микобактерий в легких, они отличаются по уровню воспаления и гистопатологическим изменениям в легких. Молеку-



лярное моделирование H2-A<sub>j</sub> молекулы показывает, что уникальные аминокислотные замены в бета-цепи локализованы в основном в P4, P6, P7 и P9 карманах пептидсвязывающей щели гетеродимера, что может приводить к изменению мотива взаимодействия антигенных пептидов с H2-A<sub>j</sub> молекулой по сравнению с H2-Ab. Вместе с тем, уникальная замена Q61K в альфа-цепи гетеродимера должна влиять на взаимодействие с Т-клеточными рецепторами и изменять TCR-репертуар. Исследование ТБ протективного Th1 ответа Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> показало, что продукция IFN- $\gamma$  в зараженных легких мышей в ответ на микобактериальные антигены значительно выше в резистентной рекомбинантной линии мышей. Важность H2-A молекулы в ответе Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup> при ТБ инфекции определяется тем, что иммунный ответ на микобактериальные антигены оказался рестриктированным именно молекулой H2-A, а не H2-E, это объясняет участие идентифицированного гена в контроле ТВ.

### РЕЗУЛЬТАТЫ QUANTIFERON®-TB GOLD И TB.SPOT ТЕСТА У ПАЦИЕНТОВ С ТУБЕРКУЛЕЗОМ И ВИЧ-ИНФЕКЦИЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНОМ УРОВНЕ ИММУНОСУПРЕССИИ

Манина В.В.<sup>1</sup>, Старшинова А.А.<sup>1</sup>, Пантелеев А.М.<sup>2,3</sup>, Журавлев В.Ю.<sup>1</sup>, Сапожникова Н.В.<sup>1</sup>, Чернохаева И.В.<sup>1</sup>, Беляева Е.Н.<sup>1</sup>, Павлова М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии», Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> СПбГБУЗ «Городская туберкулезная больница №2», Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> ГОУВПО «Первый Санкт-Петербургский Государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** Традиционно скрининг латентной туберкулезной инфекции проводится с применением пробы Манту с 2 ТЕ. При этом установленным фактом является нарастание частоты ложноотрицательных результатов пробы Манту с 2 ТЕ у пациентов с глубокой иммуносупрессией, что снижает эффективность данного метода в максимально уязвимой группе ВИЧ-инфицированных пациентов. Цель исследования: определение диагностической значимости иммунологических тестов (Quantiferon®-TB Gold (QFT), TB.SPOT тест) у пациентов с ВИЧ-инфекцией на фоне иммуносупрессии.

**Материалы и методы.** За период с 2014 по 2015 гг. проведено исследование пациентов с туберкулезом и ВИЧ-инфекцией (n=59). Пациенты с ВИЧ-инфекцией были распределены на подгруппы по уровню CD4-лимфоцитов: I группа - менее 99 кл/мкл (n=17), II группа - от 100 до 199 кл/мкл (n=12), III группа - от 200 до 349 кл/мкл (n=13), IV группа - от 350 и более кл/мкл (n=17).

**Результаты.** В I группе у пациентов с туберкулезом и ВИЧ-инфекцией с уровнем CD4-лимфоцитов менее 100 кл/мкл проба Манту с 2 ТЕ во всех случаях не показывала ни одного положительного результата. Положительные результаты QFT и TB.SPOT теста регистрировали в 52,9% (9) и 58,8% (10) случаев. Достоверных различий между частотами положительного результата этих тестов найдено не было. Частота положительных результатов QFT была достоверно выше, чем пробы Манту с 2 ТЕ (t=3,92, p<0,05). Аналогичные результаты были получены

при сравнении TB.SPOT и кожных проб (t=5,2, t=4,2, соответственно, p<0,05).

Во II группе по пр. Манту с 2 ТЕ были получены идентичные результаты, также с низким процентом положительного (8,3% (1)). Результаты QFT и TB.SPOT теста были достоверно более высокими (66,7 % (8) и 58,4% (7) соответственно, p<0,05), результаты тестов достоверно между собой не различались (p<0,05), тогда как различия между ними и пробой Манту с 2 ТЕ были достоверными.

В III группе по пр. Манту с 2 ТЕ положительные результаты отмечались в два раза чаще (23,1% (3)). Результаты QFT и TB.SPOT теста были также достоверно более высокими (53,8 % (7) и 61,6% (8) соответственно, p<0,05), результаты тестов достоверно между собой не различались (p<0,05), тогда как различия между ними и пробой Манту с 2 ТЕ были достоверными.

В IV группе по пр. Манту с 2 ТЕ положительные результаты отмечались в также в два раза чаще, I и II группах (29,4% (5)). Результаты QFT и TB.SPOT теста были еще чаще положительными (70,6% (12) и 76,5% (13) соответственно, p<0,05), результаты тестов достоверно между собой не различались (p<0,05), однако по TB.SPOT результат несколько чаще положительный.

**Заключение и выводы.** Таким образом, положительные результаты IGRA-тестов (QFT и TB.SPOT) регистрировались достоверно чаще по сравнению с пр. Манту с 2 ТЕ. При этом число положительных результатов увеличивается с прямой корреляционно зависимостью при росте уровня CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов. Проба Манту с 2 ТЕ у пациентов с ВИЧ-инфекцией с глубоким уровнем иммуносупрессии имеет низкую информативность.

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ТЕРАПИИ МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ С РАЗНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТЬЮ К ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Никоненко Б.В.<sup>1,2</sup>, Майоров К.Б.<sup>1</sup>, Апт А.С.<sup>1</sup>, Вележева В.С.<sup>3</sup>, Любимов С.Е.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «ЦНИИ туберкулеза», Москва, Россия

<sup>2</sup> Sequella, Inc., Роквилл, США

<sup>3</sup> ИЭОС РАН, Москва, Россия

**Введение.** Нами в Институте элементоорганических соединений РАН были синтезированы и исследованы около 150 гибридных соединений на основе индола. Из них 15 соединений показали MIC порядка 0.1 – 2  $\mu$ g/ml против M. tuberculosis (Mtb). Четыре из них показали in vitro активность против Mtb, изониазид-резистентного штамма CN-40 и против M. avium. Эти активные соединения будут исследованы in vivo в моделях инфекций на мышях с разной генетической восприимчивостью. В ряде работ были продемонстрированы выраженные различия в тяжести течения заболеваний, вызванных Mtb и M. avium, у мышей разных инбредных линий, и были картированы полиморфные генетических локусы и идентифицированы гены, участвующие в контроле этого разнообразия. К их числу относятся гены sst1 и Nramp1, а также классический ген Класса II комплекса H2. При этом, что лабораторные мыши являются объектом выбора для доклинической стадии тестирования противотуберкулезных препаратов, генетические различия мышей при испытании препаратов, к сожалению, часто игнорируются. Важность таких различий была показана нами в описанных ниже экспериментах.

**Цель и задачи:** Целью работы было выяснить, как генетически детерминированные различия в противотуберкулезной резистентности и иммунном ответе влияют на эффективность лечения. Для этого мы сравнили эффективность лечения у мышей ряда инбредных линий, зараженных одинаковой дозой и разными, таким образом, чтобы лечение было начато при одинаковом уровне бактериальной нагрузки в легких.

**Материалы и методы:** в работе были использованы мыши линий DBA/2, C3H, C57BL/6 и SWR/J. Для воспроизведения хронического туберкулезного процесса мышью заражали внутривенной инъекцией вирулентного штамма Mtb H37Rv в дозе 104 или 5 x 104 КОЕ/мышь. Через 3 недели начинали лечение. Для лечения мышью использовали изониазид в дозе 25 мг/кг, рифампицин 20 мг/кг, этамбутол 100 мг/кг и пиперазид 150 мг/кг. Мышей лечили пероральным введением 0,2 мл суспензии, содержащей лекарства. Через 3 и 7 недель инфекции (4 и 8 недель лечения) выделяли легкие, гомогенизировали в фосфатном буфере и 10-кратные серийные разведения сеяли на чашки с агаром для определения количества КОЕ.

**Основные результаты:** При заражении мышью одинаковой дозой микобактерий инфекция достигает разных уровней к 3-й и 7-й неделе у мышью разных линий, и 8-недельное лечение, начатое на третьей неделе инфекции, приводит к разным уровням бактериальной нагрузки в легких у этих мышью. Начальные условия можно сделать стандартными за счет заражения разными, предварительно подобранными дозами. Мы отработали такие условия и добились того, что мышью с оппортунистической восприимчивостью к инфекции к началу лечения (3 недели инфекции) достигли одинакового уровня КОЕ в легких. Для мышью DBA/2 (чувствительные) и C57BL/6 (резистентные) log КОЕ в начале лечения был 6,55. При такой усовершенствованной схеме эксперимента лечение оказалось более эффективно у чувствительных мышью DBA/2 (через 8 недель log КОЕ=0,15) по сравнению с резистентными C57BL/6 (1,84). Более того, среди чувствительных мышью линии DBA/2 легкие только 20% мышью после лечения оставались Mtb-положительные, в то время как среди всех мышью C57BL/6 не было Mtb-отрицательных легких.

**Заключение**

- У мышью с различной генетически детерминированной восприимчивостью к туберкулезу стандартное лечение производит неодинаковый эффект.
- При стандартизации инфекции (начале лечения при одинаковом уровне инфекции в легких) лечение более эффективно у более восприимчивых к туберкуле-

зу мышью. Это, по-видимому, связано с более сильным давлением на микобактерии защитных механизмов резистентного хозяина, что замедляет их рост и метаболизм, делая микобактерии менее восприимчивыми к лекарствам.

- Для более полной характеристики новых противотуберкулезных препаратов весьма желательно использовать по меньшей мере мышью двух инбредных линий с разной генетической чувствительностью к инфекции.

**ВЛИЯНИЕ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ ДВОЙНОЙ ТЕРАПИИ**

**Носик М.Н., Рыманова И.В., Севостьянихин С.Е., Сергеева Н.В., Собкин А.Н.**

*ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия  
Туберкулезная клиническая больница №3  
им. Г.А. Захарьина, Москва, Россия*

**Введение.** Провоспалительные и регуляторные цитокины играют важную роль в иммунопатогенезе как ВИЧ-инфекции, так и туберкулеза (ТБ). Провоспалительный ответ организма, индуцируется цитокинами Th1 класса, которые являются главными медиаторами защитного иммунитета. Однако известно, что эти же цитокины облегчают инфицирование клеток ВИЧ. Иммунный ответ, индуцируемый регуляторными цитокинами Th2 класса, опосредованно вызывает устойчивость к инфицированию ВИЧ, но вполне возможно могут активировать латентную форму ТБ. На данный момент пока еще не изучены уровни выработки данных цитокинов и их роль в иммунопатогенезе, при одновременном инфицировании ВИЧ/ТБ, и в особенности, в процессе получения больными антиретровирусной и противотуберкулезной терапии.

**Целью настоящего исследования** являлось изучить экспрессию провоспалительных и регуляторных цитокинов (ИЛ-2, ФНО-α, ИЛ-4, ИЛ-10) при сочетанной инфекции ВИЧ/ТБ в процессе получения больными двойной терапии.

**Материалы и методы.** Исследование уровня экспрессии цитокинов в сыворотке крови пациентов проводилось до начала терапии, затем через 60, 90 и 150 дней после начала лечения (диагностические наборы «Вектор-Бест», с чувствительностью 0-5 пг/мл). Одновременно со взятием образцов крови, проводилось определение вирусной на-

**ТАБЛИЦА (К ТЕЗИСАМ НОСИК М.Н. И ДР.)**

пг/мл	CD4+<200кл/мм <sup>3</sup>		CD4+>200кл/мм <sup>3</sup>	
	до	после	до	после
ИЛ-2	до	12,5 (8÷30)	до	13,3 (5÷25)
	после	11,8 (5÷20)	после	11,7 (5÷15)
ФНО- α	до	6,3 (0÷25)	до	3,9 (0÷15)
	после	5,8 (0÷15)	после	3,5 (0÷10)
ИЛ-4	до	7,3 (0÷45)	до	5,7 (0÷18)
	после	1,1 (0÷10)	после	1,2 (0÷5)
ИЛ-10	до	9,1 (5÷25)	до	4,1 (0÷7)
	после	5,2 (0÷11)	после	3,1 (0÷5)

Для всех показателей значение p<0,05 считалось достоверным

грузки и иммунного статуса. Пациенты были разбиты на 2 группы, в зависимости от количества CD4+клеток: Группа 1 (CD4+<200кл/мм<sup>3</sup>) и Группа 2 (CD4+>200кл/мм<sup>3</sup>).

**Результаты.** Первоначально в исследуемую группу было включено 85 пациентов с сочетанной инфекцией ВИЧ/ТБ, которые ранее не получали терапию. Впоследствии, 12 человек были исключены из исследования, из-за нарушения режима лекарственной терапии. Среди пациентов преобладали мужчины: 67,5%. Медианный возраст у мужчин составил 35,7 лет (27÷48), а у женщин – 38,6 лет (29÷71). Было выявлено, что вне зависимости от иммуносупрессии, на протяжении лечения уровень экспрессии ИЛ-2 и ФНО- $\alpha$  оставался фактически неизменным, несмотря на повышение количества CD4+клеток и снижение вирусной нагрузки. Отмечена незначительная разница в выработке ИЛ-4 и ИЛ-10 для Группы 1 и Группы 2, которая была наиболее заметна до начала терапии.

**Заключение.** При сочетанной инфекции ВИЧ/ТБ наблюдается подавление экспрессии цитокинов Th1 и Th2 класса, о чем свидетельствует низкий уровень провоспалительных и регуляторных цитокинов.

#### **ВАЛИДАЦИЯ И МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА МТБ-27 ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ПРОЦЕССА**

**Пантелеев А.В., Никитина И.Ю., Космиади Г.А.,  
Васильева И.А., Лядова И.В.**

*ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский  
институт туберкулеза», Москва, Россия*

**Введение.** В связи с широким распространением туберкулеза (ТБ) и латентной ТБ инфекции (ЛТБИ), важной задачей является своевременная диагностика и дифференциальная диагностика активного ТБ (АТБ) и ЛТБИ. При отсутствии бактериовыделения или мокроты решение этой задачи вызывает большие трудности. В таких ситуациях в диагностических целях часто используются иммунологические методы: туберкулиновый тест, Диаскинтест® и «интерфероновые» тесты (IGRAs). Существующие иммунологические методы позволяют выявить наличие инфицирования, но не позволяют оценить активность инфекционного процесса и дифференцировать АТБ и ЛТБИ.

Ранее для дифференциальной диагностики АТБ и ТБИ нами был предложен тест «Mtb-CD27», основанный на определении процентного содержания лимфоцитов CD27low среди лимфоцитов CD4, продуцирующих INF- $\gamma$ + (клетки CD27lowINF- $\gamma$ +) в ответ на стимуляцию антигенами микобактерий (Mtb). Было показано, что содержание клеток CD27lowINF- $\gamma$ + выше 35,1% характерно для АТБ и позволяет дифференцировать АТБ и ЛТБИ с чувствительностью 74% и специфичностью 83%. Одним из ограничений теста являлось низкое содержание INF- $\gamma$ -продуцирующих лимфоцитов у ряда людей, что снижало достоверность определения процентного содержания клеток CD27lowINF- $\gamma$ +

**Цель и задачи.** Целью настоящей работы явилась валидация теста «Mtb-CD27» и разработка его модификации, основанной на измененном подходе к детекции Mtb-реактивных Т-лимфоцитов.

**Материалы и методы.** В исследование были включены 53 больных, поступившие в ФГБНУ «ЦНИИТ» для лечения по поводу ТБ легких в возрасте от 18 до 80 лет (31

женщина и 22 мужчины). У 21 пациента был установлен диагноз инфильтративный ТБ, у 13 – фиброзно-кавернозный ТБ, у 8 – диссеминированный ТБ, у 5 – казеозная пневмония, у 6 пациентов множественная туберкулема. Группа «контактов» включала 17 человек (12 женщин, 5 мужчин, в возрасте от 25 до 65 лет), имеющих длительный (не менее 1 года) контакт с больными ТБ и высокий риск наличия ЛТБИ. Клетки крови стимулировали PPD и с помощью проточной цитометрии определяли процент лимфоцитов CD4, продуцирующих INF- $\gamma$  (INF- $\gamma$ +), TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ +), INF- $\gamma$  или TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ +/INF- $\gamma$ +), а также процент клеток CD27low среди каждой из указанных популяций.

**Результаты.** Содержание исследуемых популяций Mtb-реактивных Т-лимфоцитов у больных ТБ и контактов составило: INF- $\gamma$ + - 0,52±0,10% и 0,23±0,04% (p=0.0008) соответственно; TNF- $\alpha$ +: 0,56±0,1% и 0,33±0,04% (p=0.08); TNF- $\alpha$ +/INF- $\gamma$ + - 0,65±0,10% и 0,35±0,04% (p=0.006). Однако построение ROC кривых показало, что содержание указанных популяций не позволяет надежно дифференцировать АТБ и ЛТБИ (чувствительность и специфичность ниже 70%). В то же время определение содержания клеток CD27lowINF- $\gamma$ + дифференцировало АТБ и ЛТБИ с чувствительностью 81% и специфичностью 86% (порог 34,5%). Определение содержания клеток CD27low среди лимфоцитов TNF- $\alpha$ + дифференцировало больных ТБ и контактов с чувствительностью 77,3% и специфичностью 74% (пороговое значение - 32,7%), а определение клеток CD27low среди лимфоцитов TNF- $\alpha$ +/INF- $\gamma$ + - с чувствительностью 81,0% и специфичностью 84% (порог 35,0%). Существенно, что количество Mtb-реактивных клеток, выявляемых по продукции INF- $\gamma$  или TNF- $\alpha$ , было выше, чем количество клеток, выявляемых только по продукции INF- $\gamma$  (INF- $\gamma$ +), что повышало достоверность определения содержания среди них клеток CD27low.

**Заключение.** Проведенные исследования: подтверждают возможность использования теста «Mtb- INF- $\gamma$  CD27» для дифференциации АТБ и ЛТБИ, уточняют порог содержания клеток позволяющий разделять АТБ и ЛТБИ (34,5%, ранее – 35,1%), а также предлагают модификацию метода, основанную на детекции Mtb-реактивных лимфоцитов по продукции двух цитокинов (TNF- $\alpha$ +/INF- $\gamma$ +

#### **НАКОПЛЕНИЕ НЕЗРЕЛЫХ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК У МЫШЕЙ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ**

**Серова А.Ю., Цыганов Е.Н., Вербина А.М.,  
Лядова И.В.**

*ФГБНУ «ЦНИИТ», Москва, Россия*

Роль нейтрофилов при туберкулезной (ТБ) инфекции остаётся не до конца понятной. С одной стороны, нейтрофилы формируют первую линию защиты при инфекции, с другой стороны, нерегулируемая нейтрофильная реакция приводит к повреждению инфицированных тканей. Ранее было показано, что у мышей тяжёлая ТБ инфекция сопровождается накоплением в лёгких клеток, несущих нейтрофильные маркёры Gr-1 и Ly-6G. Полученные данные интерпретировались как данные о патогенной роли нейтрофилов при ТБ. Позднее мы обнаружили, что клетки, несущие маркёры Gr-1/Ly-6G и накапливающиеся в лёгочной ткани мышей на прелетальной стадии ТБ

инфекции, отличаются от обычных нейтрофилов значительно более низким уровнем экспрессии маркеров Gr-1/Ly-6G (фенотип Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup>). В данной работе мы изучали природу клеток Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> у мышей при экспериментальной ТБ инфекции.

Нами было обнаружено, что в лёгких, селезёнке и костном мозге здоровых мышей Gr-1/Ly-6G-позитивные клетки представлены, в основном, типичными нейтрофилами (фенотип Gr-1<sup>hi</sup>/Ly-6G<sup>hi</sup>). Клетки со сниженным уровнем экспрессии маркеров Gr-1/Ly-6G (Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup>) у здоровых мышей не формировали популяцию, их содержание было невелико (1-6%). При прогрессировании инфекции содержание клеток Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> значительно увеличивалось, достигая максимальных значений на прелатентной стадии (30–40%).

Клетки Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> экспрессировали общие для моноцитов и нейтрофилов маркеры CD11b и Ly-6C, имели высокий уровень экспрессии интегрина CD49d, свойственного мигрирующим клеткам. Кроме того, исследуемые клетки экспрессировали маркер моноцитов F4/80. Таким образом, для популяции Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> мы наблюдали необычное сочетание одновременной экспрессии маркеров нейтрофилов и моноцитов. Было показано, что для клеток Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> был характерен тип ядра, свойственный моноцитарным или незрелым миелоидным клеткам. Дальнейшие исследования показали, что выделенная популяция клеток Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> способна супрессировать пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro*, и продукцию ими ИФН- $\gamma$ . Кроме того, при адоптивном переносе клеток Gr-1<sup>dim</sup>/Ly-6G<sup>dim</sup> мы наблюдали снижение содержания ИФН- $\gamma$  в лёгочной ткани мышей-реципиентов.

Таким образом, при прогрессировании экспериментальной ТБ инфекции происходит накопление не типичных нейтрофилов, а популяции незрелых миелоидных клеток, способных супрессировать иммунный ответ Т-клеток *in vitro*, что может представлять собой новый механизм прогрессирования ТБ инфекции.

#### СОВРЕМЕННЫЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ТЕСТЫ В ДИАГНОСТИКЕ ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ

Старшинова А.А., Ананьев С.М., Корнева Н.В.,  
Довгалюк И.Ф., Ильина Н.И., Плахтиенко М.В.,  
Бобкевич Е.М., Пинегин Б.В., Муругин В.В.

ФГБУ «Санкт-Петербургский Научно-Исследовательский институт фтизиопульмонологии»  
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия  
ФГБУ «Государственный научный центр Институт  
иммунологии» ФМБА, Москва, Россия

**Введение.** К современным методам выявления пациентов с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ) относятся IGRA-тесты (QuantiFERON®-TB Gold и T-SPOT.TB) и отечественный препарат ДИАСКИНТЕСТ®, так как их положительные результаты ассоциированы с процессом активного размножения *M. tuberculosis*. T-SPOT.TB, применяемый в Европе с 2004 года, является диагностическим тестом, основанном на количественной оценке сенсibilизированных Т-лимфоцитов в ответ на стимуляцию пептидными антигенами (ESAT-6 (early-secreted antigenic target), CFP-10 (culture filtrate protein)). Цель исследования: определить диагностическую специ-

фичность Т-SPOT.TB и Диаскинтеста в выявлении ЛТИ у детей с отягощенным аллергологическим анамнезом.

**Материал и методы.** Проведено открытое одномоментное исследование. Группу включения составили 92 ребенка в возрасте от 3 до 15 лет, обследованные в амбулаторно-поликлиническом отделении ФГБУ «СПБ НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России и в отделении иммунопатологии детей ФГБУ «Государственный научный центр Институт иммунологии» ФМБА в период с апреля 2014 по март 2015 гг. После проведения унифицированного комплекса обследования с применением клинических, иммунологических (пробы Манту 2 ТЕ, Диаскинтест) и лучевых методов (по показаниям). Всем пациентам был выполнен Т-SPOT.TB. Проведен расчет диагностической специфичности иммунологических тестов.

**Основные результаты.** Из 92 обследованных преобладали пациенты младшего школьного возраста (7-11 лет) – 37 (40,2%), дошкольного возраста (3-6 лет) – 32 (34,7%), 12-14 лет – 23 (25%). Распределение по полу было практически равным: девочек – 47 (51,1%), мальчиков – 45 (48,9%). Поводом для обследования у 4 (4,3%) детей был вираж туберкулиновых проб, у 75 (81,5%) – нарастание чувствительности к туберкулину по п.Манту 2 ТЕ, из них у 62 (67,4%) – до гиперергического результата, у 13 детей (14,1%) – обращение с жалобами. Все дети были вакцинированы БЦЖ при рождении. 62 ребенка (67,4%) в анамнезе имели сопутствующую аллергическую патологию (24 – бронхиальная астма, 11 – атопический дерматит, 7 – поллиноз, 1 – крапивница). Значимых различий результатов по п. Манту 2ТЕ у детей с ЛТИ (n=5) и здоровых (n=87) не выявлено. Положительный результат по п. Манту 2ТЕ регистрировали у 97,7% (85) здоровых и у 100% (5) - с ЛТИ. Диаскинтест в подавляющем большинстве случаев был отрицательным - 96,6% (84), в 3,4% (3) – сомнительным, у 5 детей тест был положительным, из них у 2 – гиперергический (>14 мм). Результаты Т-SPOT.TB у всех детей с отрицательными и сомнительными результатами ДСТ (n=87) были отрицательными. Положительные результаты Т-SPOT.TB регистрировали в 5,4% (5), что свидетельствовало о наличии ЛТИ. Расчет диагностической специфичности тестов показал следующие результаты: ТВ.SPOT (100%), ДСТ (96,6%).

**Заключение.** Проведенное исследование показало, что Т-SPOT.TB и Диаскинтест имеют высокую специфичность. Диагностика ЛТИ у детей, с отягощенным аллергологическим анамнезом наиболее информативна по Т-SPOT.TB. Результаты Т-SPOT.TB сопоставимы с результатами Диаскинтеста в 96,7% случаев. Однако у данной категории детей ТВ.SPOT.TB является методом выбора.

#### ФАКТОРЫ НАРУШЕНИЙ СИГНАЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ В Т-ЛИМФОЦИТАХ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Уразова О.И.<sup>1</sup>, Есимова И.Е.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Общеизвестно, что основой патогенеза туберкулеза легких (ТЛ) является дисрегуляция антигенспецифического иммунитета, опосредованного активацией, пролиферацией и дифференцировкой Т-лимфоцитов-хелперов

(Th) типа 1. Установлено, что на этапе запуска иммунного ответа индукция Th осуществляется путем как прямого контактного их взаимодействия с антигенпрезентирующими клетками (АПК), так и посредством секретиремых АПК цитокинов. В обоих случаях в Т-клетках происходит запуск механизмов сигнальной трансдукции, усиливающих и передающих внешний стимул в ядро лимфоцита, где активируются соответствующие гены, в частности гены IL2 (при рецептор-зависимой активации Т-лимфоцита) и IFNG (при активации Т-лимфоцита цитокинами АПК). Их дисрегуляция является причиной дисфункции Т-лимфоцитов, однако вопрос о том, каким образом это происходит при туберкулезе, остается открытым и требует детального изучения.

**Цель:** выявить патогенетические факторы нарушения внутриклеточной передачи сигналов активации в Т-лимфоцитах при туберкулезе легких.

**Задачи:** 1) Оценить содержание IL-2+ и IFN-γ+ Т-лимфоцитов в крови у больных туберкулезом легких; 2) Охарактеризовать состояние основных путей внутриклеточной трансдукции сигналов рецептор- и цитокин-опосредованной активации Т-лимфоцитов у больных туберкулезом легких.

**Материалы и методы.** В программу исследования вошли 97 пациентов (75 мужчин и 22 женщины) в возрасте 20-55 лет с впервые выявленным ТЛ. Группу сравнения составили 35 здоровых добровольцев. Материал исследования: лимфоциты, выделенные из цельной крови. Культивирование клеток проводили в полной питательной среде в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C без и с добавлением индукторов и блокатора внутриклеточного транспорта (монензин, 5 мкг/мл). В качестве индукторов использовались моноклональные антитела к молекулам CD3 (1 мкг/мл) и CD28 (4 мкг/мл) («R&D Systems», США), рекомбинантные интерлейкины IL-12 (20 нг/мл) и IL-27 (10 нг/мл) («eBioscience Company», США). Время инкубации лимфоцитов с индукторами для оценки синтеза IFN-γ и IL-2 составляло 10 ч; для оценки экспрессии транскрипционных факторов T-bet, STAT1, STAT4 – 60 мин, NF-κB (p50), AP-1, NFAT2 – 40 мин; для оценки активных форм тирозинкиназ – 60 мин. Результаты оценивали методами проточной цитометрии (с использованием изотипических контролей «R&D Systems», США) и твердофазного иммуноферментного анализа («Cusabio Biotech», США). Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных алгоритмов биометрии.

**Основные результаты.** У больных ТЛ установлено снижение относительного и абсолютного числа IL-2- и IFN-γ-синтезирующих Т-клеток (CD3+CD28+IL-2+ и CD3+IFN-γ+) на фоне повышенного содержания CD3 IFN-γ+ лимфоцитов в крови. Указанные нарушения сочетаются с дефицитом в Т-лимфоцитах основных компонентов трансдукции сигналов активации синтеза цитокинов – IL-2 и IFN-γ, о чем свидетельствует снижение числа клеток с иммунофенотипами CD3+AP-1+, CD3+NF-κB+, CD3+NFAT2+, CD3+T-bet+, содержания активных форм тирозинкиназ JAK1, JAK2, TYK2 и факторов транскрипции STAT1, STAT4 в лизатах лимфоцитов. Выраженность установленных изменений в большей степени зависит от лекарственной устойчивости возбудителя заболевания и в меньшей степени – от клинической формы ТЛ.

**Заключение.** Нарушения IL-2- и IFN-γ-синтезирующей функции Т-лимфоцитов у больных ТЛ

связаны с дефицитом ключевых тирозинкиназ и транскрипционных факторов, опосредующих внутриклеточную трансдукцию сигналов рецептор- и цитокин-зависимой активации Т-клеток.

## АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА IL18 ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ

Хасанова Р.Р.<sup>1,2</sup>, Уразова О.И.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>2</sup>Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

<sup>3</sup>Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Внедрение молекулярных методов в изучение патогенеза туберкулеза легких (ТЛ) вскрыло новые стратегии в его диагностике и лечении. IL-18 – цитокин, секретиремый антигенпрезентирующими (дендритными) клетками и активирующий Th1-иммунный ответ; недостаточная продукция данного цитокина опосредует неспособность иммунной системы организма ограничивать рост и размножение микобактерий, что приводит к тяжелому течению заболевания и неблагоприятному его исходу. Известно, что генетическая предрасположенность является фактором заболевания ТЛ и его манифестации, при этом большое значение уделяется поиску полиморфных вариантов генов цитокинов, опосредующих дисрегуляцию иммунного ответа на различных стадиях его реализации. Полиморфизм гена IL18 в данном аспекте не является исключением.

**Целью исследования** явилось изучить взаимосвязь полиморфизма G-137C (rs187238) гена IL18 с уровнем продукции IL-18 in vitro при инфильтративном ТЛ.

**Материалы и методы.** Обследовано 177 больных с впервые выявленным инфильтративным ТЛ до начала противотуберкулезной терапии. Исследование выполнено в лаборатории кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. Экстракцию ДНК из цельной венозной крови проводили стандартным фенол-хлороформным методом. Исследование полиморфизма G-137C гена IL18 (rs187238) проводили аллель-специфической амплификацией специфических участков генома с использованием трех праймеров – общего и двух аллель-специфических, – у которых нуклеотиды на 3'-конце различаются и комплементарны нуклеотидам соответствующих аллелей по исследуемому SNP. Для повышения специфичности ПЦР в структуре праймеров заменяли вторые с 3'-конца нуклеотиды, не комплементарные матрице. В качестве маркера размера ДНК использовали плазмиду pUC19, расщепленную рестриктазой MspI («СибЭнзим», Россия). Результат реакции оценивали электрофорезом: образцы длиной 208 п.о. содержали аллель С, образцы с аллелем G – 209 п.о., полиморфизм CG оценивали по продуктам в обеих дорожках геля. Содержание IL-18 в супернатантах культуральных суспензий DC, генерированных in vitro из моноцитов периферической крови, оценивали твердофазным иммуноферментным «сэндвичевым» методом по инструкции «Biosource» (США).

**Основные результаты.** Анализ частот аллелей G-137C гена IL18 выявил, что у здоровых доноров аллель G полиморфизма гена IL18 встречается чаще, чем аллель С, в 2,9 раза, а у пациентов с инфильтративным ТЛ – в 4,5 раза.

При оценке частоты распределения генотипов полиморфизма G-137C гена IL18 установлено, что у здоровых доноров в 54,6% случаев встречается генотип GG, в 39,9% случаев – GC и в 5,5% случаев – гомозиготный генотип CC. У больных ТЛ генотип GG по частоте встречаемости также преобладал над гомозиготным генотипом по аллелю C и гетерозиготным генотипом GC. Обнаружены ассоциации инфильтративного ТЛ с аллелем G ( $OR_1=1,51$  (1,06-2,17)) и генотипом GG ( $OR_1=2,36$  (1,52-3,69)) полиморфизма G-137C гена IL18. Зависимость уровня секреции IL-18 *in vitro* от аллельного варианта полиморфизма G-137C гена IL18 у здоровых доноров показала следующее: максимальный уровень секреции IL-18 (44,14 (40,19-46,20) пг/мл) обнаруживался у носителей генотипа GG, а минимальный (27,14 (22,94-39,04) пг/мл;  $pGG/CC<0,05$ ) – у гомозигот CC. У больных инфильтративным ТЛ обнаруживалась иная закономерность – максимальный уровень продукции IL-18 *in vitro* (38,64 (31,40-39,58)) пг/мл, напротив, был характерным для носителей генотипа CC. У больных ТЛ – носителей генотипов GG и GC полиморфизма G-137C гена IL18 выявлялось снижение продукции IL-18 по сравнению с таковым у здоровых доноров ( $p<0,05$ ). Минимальный ее уровень обнаруживался при носительстве генотипа GC (23,02 (19,26-28,15) пг/мл;  $pGG/GC<0,05$ ;  $pGC/CC<0,05$ ).

**Заключение.** Среди больных инфильтративным ТЛ «дикий» генотип GG полиморфизма G-137C (rs187238) гена IL18 встречается чаще; носительство генотипов GG и GC ассоциируется с понижением продукции IL-18 *in vitro* относительно нормы, а гомозиготный генотип CC – с повышенным уровнем его секреции. По-видимому, полиморфизм G-137C (rs187238) гена IL18 не связан с дисрегуляцией индуктивной фазы иммунного ответа при инфильтративном ТЛ.

## ИММУНОФЕНОТИП ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Хасанова Р.Р.<sup>1,2</sup>, Уразова О.И.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия

<sup>3</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Эффективное течение начального этапа антиминобактериального иммунного ответа обусловлено взаимодействием между зрелыми функционально активными дендритными клетками (DC) и Т-лимфоцитами. Степень зрелости и функциональная активность DC оценивается по уровню экспрессии поверхностных молекул, в том числе TLRs, CD80 и CD86. Предполагается, что длительная персистенция *M. tuberculosis* оказывает влияние на созревание и функциональные свойства DC путем изменения экспрессии соответствующих белков.

**Цель работы** заключалась в оценке экспрессии молекул TLR2, CD80 и CD86 на DC у больных инфильтративным и диссеминированным туберкулезом легких (ТЛ).

**Материалы и методы.** Исследовано 98 больных с впервые выявленным инфильтративным ( $n=36$  (36,73%)) и диссеминированным ( $n=62$  (63,27%)) ТЛ до лечения. Экспериментальная часть работы выполнялась на базе лаборатории кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России. Из гепаринизированной ве-

нозной крови моноциты выделяли центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина. Культивировали клетки в полной питательной среде с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл пенициллина-стрептомицина, 0,29 мкг/мл L-глутамин, IL-4 и GM-CSF, при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 7 дней. Заменяли питательную среду на 3-и и 5-е сутки культивирования, на 5-е сутки клетки стимулировали липополисахаридом. Иммунофенотипировали DC на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител, меченных флуоресцентными красителями (FITC, PE, PerCP), и изотипических контролей («R&D Systems», США). Результаты обрабатывали общепринятыми статистическими методами; различия в независимых выборках оценивали критерием Манна-Уитни, достоверность рассчитывали при  $p<0,05$ .

**Основные результаты.** В ходе проведенных исследований обнаружено увеличение количества DC, трансформированных из моноцитов периферической крови, при инфильтративном (до 35,10 (28,98-51,20) %) и диссеминированном (до 39,20 (25,95-68,73) %) ТЛ по сравнению с аналогичным показателем у здоровых доноров (20,83 (17,20-24,50) %,  $p<0,05$ ). Анализ CD-субпопуляционного состава DC у больных ТЛ в зависимости от клинической формы заболевания выявил повышение количества CD80+ DC только в группе больных диссеминированным ТЛ (3,40 (3,20-5,90) %) – в 2,6 раза ( $p<0,001$ ) относительно группы контроля (1,30 (0,82-1,91) %), а также сравнительно с группой больных инфильтративной формой ТЛ (1,60 (1,40-4,60) %). При оценке содержания CD86+ и CD80+CD86+ DC, трансформированных из моноцитов периферической крови, установлено его понижение как у больных инфильтративным ТЛ (в 1,9 ( $p<0,0001$ )) и в 1,7 раза ( $p<0,05$ )), так и диссеминированным ТЛ (в 1,4 раза ( $p<0,05$ ) и в 1,8 раза ( $p<0,05$ )) по сравнению с контрольными значениями (60,35 (48,05-71,25) % и 46,85 (43,47-56,51) % соответственно). При этом количество DC, позитивных по маркеру CD86, в группе больных инфильтративным ТЛ (31,70 (24,10-35,60) %) было ниже, чем у пациентов с диссеминированным ТЛ (43,90 (37,40-45,10) %). В то же время содержание CD80+CD86+ DC у больных инфильтративным ТЛ (27,04 (15,90-41,07) %) и диссеминированным ТЛ (26,14 (16,05-40,60) %) практически не различалось. Число DC, несущих рецепторы TLR2, при обеих клинических (инфильтративной и диссеминированной) формах ТЛ (1,40 (0,65-2,89) % и 1,50 (0,20-2,10) % соответственно) было значимо ( $p<0,001$ ) ниже нормы (3,73 (3,70-3,95) %).

**Заключение.** У больных ТЛ активность трансформации моноцитов крови в DC выше, чем у здоровых доноров. Наряду с этим, отмечаются признаки дисфункции DC, что проявляется уменьшением экспрессии на них поверхностных рецепторов для связывания *M. tuberculosis* (TLR2) в сочетании с дефицитом молекул костимуляции CD86 (необходимых для контактного взаимодействия DC с Т-лимфоцитом в индуктивную фазу иммунного ответа) и числа иммуногенных DC с иммунофенотипом CD80+CD86+.

## АКТИВАЦИЯ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ВКЛЮЧАЕТ НИТРИТ-НЕЗАВИСИМЫЙ ПУТЬ

Шепелькова Г.С., Майоров К.Б., Евстифеев В.В.,  
Апт А.С.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский  
институт туберкулеза», Москва, Россия

Иммунный ответ при туберкулезе (ТБ) в значительной степени определяется способностью активированных легочных макрофагов хозяина подавлять рост микобактерий. Активация макрофагов происходит за счет Т-лимфоцитов CD4<sup>+</sup>. Недавно было показано, что существуют две разные субпопуляции эффекторных лимфоцитов CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>lo</sup>CD44<sup>hi</sup>, одна из которых имеет поверхностный фенотип CD27<sup>hi</sup>, а другая CD27<sup>lo</sup>. Как показано в нашей лаборатории на модели экспериментальной туберкулезной инфекции, эти типы клеток различаются по жизнеспособности и по способности продуцировать воспалительные цитокины IFN-γ и TNF-α. Однако до настоящего времени не выяснено, различаются ли лимфоциты CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>hi</sup> (CD27<sup>hi</sup>) и CD62L<sup>lo</sup>CD27<sup>lo</sup> (CD27<sup>lo</sup>) по способности активировать макрофаги и стимулировать подавление роста микобактерий.

Исследования проводили на мышах линий C57BL/6 (B6) и C57BL/6-TNF-α/- (B6-TNF-α-KO). Макрофаги перитонеального экссудата культивировали *in vitro* в присутствии *M. tuberculosis* и Т-лимфоцитов CD27<sup>hi</sup> и CD27<sup>lo</sup>. Через 72 часа после культивирования в культурах оценивали продукцию NO и рост микобактерий.

Перитонеальные макрофаги характеризовались незначительной спонтанной активацией (NO<sub>2</sub>)-, которая не изменялась при добавлении в культуру микобактерий. При соотношении в культуре Т-лимфоцит:макрофаг от 1:1 до 1:5 обе субпопуляции эффекторов не отличались по своей активности. При снижении количества Т-лимфоцитов в культурах были выявлены различия между субпопуляциями эффекторов CD27<sup>hi</sup> и CD27<sup>lo</sup>: активирующее действие лимфоцитов CD27<sup>hi</sup> полностью исчезало при соотношении Т-клетка:макрофаг=1:25, а CD27<sup>lo</sup> при соотношении 1:125. В тех же культурах оценивали рост микобактерий. Без дополнительной стимуляции макрофаги умеренно ограничивали рост микобактерий (подавление роста микобактерий 20%). В культурах содержащих Т-лимфоциты CD27<sup>hi</sup> в соотношении Т-клетка:макрофаг=1:25 подавление роста микобактерий составляло 35%, в то время как эффекторы CD27<sup>lo</sup> стимулировали подавление роста микобактерий на 50% при соотношении Т-клетка:макрофаг=1:625, при котором активные формы азота уже не обнаруживаются. Это дает возможность предположить наличие второго независимого механизма активации. Сравнение уровня экспрессии генов *ifn-γ* и *tnf-α* в инфицированных макрофагах, активированных Т-лимфоцитами CD27<sup>hi</sup> и CD27<sup>lo</sup> показало, что CD27<sup>lo</sup> значительно сильнее увеличивают уровень транскрипции ключевых цитокинов. Для проверки вклада TNF-α мы использовали мышей с нокаут-мутацией в гене, кодирующем TNF-α (B6-TNF-α-KO). В системе без TNF-α Т-клетки CD27<sup>hi</sup> были способны активировать макрофаги (включение 3[H]-урацила микобактериями), а также стимулировать продукцию NO последними только при соотношении Т-клетка : макрофаг = 1:5, в то время как Т-лимфоциты CD27<sup>lo</sup> не стимулировали продукцию (NO<sub>2</sub>)-, однако, активировали

бактериостатическую функцию макрофагов при соотношении Т-клетка:макрофаг от 1:5 до 1:125. Для подтверждения существования нитрит-независимого механизма активации бактериостатической функции макрофагов Т-лимфоцитами CD27<sup>lo</sup> на следующем этапе работы мы использовали селективный ингибитор iNOS – (N6-(1-иминоэтил)-L-лизин, L-NIL). Добавление L-NIL в культуру макрофагов (из мышей B6) с микобактериями аннулировало активирующее действие рекомбинантного IFN-γ на бактериостатическую функцию макрофагов и продукцию последними (NO<sub>2</sub>)-. Наличие в культурах клеток L-NIL характеризовалось сильным снижением количества (NO<sub>2</sub>)- как при CD27<sup>hi</sup>, так и при CD27<sup>lo</sup>, однако, Т-лимфоциты CD27<sup>lo</sup> активировали антимикобактериальную активность макрофагов при соотношении Т-клетка:макрофаг от 1:25 до 1:125, что подтвердило наличие нитрит-независимого механизма активации бактериостатической функции макрофагов высокодифференцированными эффекторами CD27.

Итак, CD27<sup>lo</sup> намного эффективнее активируют перитонеальные макрофаги. Данный механизм активации не зависит ни от присутствия TNF-α, ни от выработки NO.

## МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И РАСТВОРИМЫЕ МАРКЕРЫ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

Эсмедляева Д.С., Дьякова М.Е.

ФГБУ «СП-6 НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ,  
Санкт-Петербург, Россия

Система Fas/Fas-ligand (FasL) играет важную роль в регуляции апоптоза и деструкции тканей. Как и многие поверхностные антигены иммунокомпетентных клеток рецепторы и лиганды этой системы могут находиться не только в мембранной, но и в растворимой форме (sF). Функции растворимых форм антигенов довольно разнообразны и могут быть прямо противоположны функциям их мембранных гомологов. Образование sF возможно либо за счет альтернативного сплайсинга мРНК, либо за счет протеолитического расщепления мембранных форм. Хотя известно, что в естественных условиях переход FasL в sFasL происходит под воздействием матриксных металлопротеиназ (MMPs), клинических данных об отношениях между системами Fas/FasL и их потенциальных регуляторах – членах системы MMPs/ингибиторы (TIMPs) у больных туберкулезом легких (ТЛ) практически нет. Согласно немногочисленным данным, в протеолитическом расщеплении FasL участвуют представители различных семейств MMPs- матрилизин (MMP-7) и стромелизин-1 (MMP-3), расщепляющие кроме того широкий диапазон субстратов.

**Цель.** Оценить роль MMP-7, MMP-3 и TIMP-1 в механизме sFas/sFasL зависимого сигнального пути апоптоза у больных ТЛ.

**Материалы и методы.** Обследовано 92 больных ТЛ: 69 (75%) мужчин и 23 (25%) женщин в возрасте от 20 до 60 лет с инфильтративным (36), кавернозным (15), фиброзно-кавернозным (23) ТЛ и с туберкулезом (18). Распространенность процесса в пределах от 1 до 3 сегментов установлена в 58%, более 3 – 42% случаев. Методом микроскопии и посева были выделены микобактерии туберкулеза (МБТ) у 73,44% больных (скудное в 28,5% и массивное – в 38% случаев), среди них в отношении чувствительно-

сти к противотуберкулезным препаратам лекарственно устойчивые (ЛУ) определялись в 48,89% случаев. Уровни MMP-3, MMP-7, TIMP-1, sFas, sFasL в сыворотке крови определялись методом ELISA с помощью наборов фирмы Bender MedSystems, согласно протоколу производителя. Детекция лимфоцитов с поверхностным фенотипом CD95+ - методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Calibur фирмы Becton Dickinson (BD USA), с использованием моноклональных антител того же производителя. Статистическая обработка результатов проведена на основе пакета программы Statistica 7.

Уровни MMP-3 и MMP-7 в референтных пределах отмечены у 89,8% и 43,4% больных соответственно, превышающие их в 10,2% и 32% случаях. У 22% обследованных зарегистрированы значения MMP-7 ниже референтного уровня. В целом больным ТЛ оказалось свойственно существенное повышение уровня TIMP-1. При этом число лимфоцитов с CD 95+ было повышенным ( $p \leq 0,003$ ), концентрация sFas не отличалась от нормы, а sFasL в сыворотке крови у больных ТЛ была ниже предела обнаружения (менее 0,1 пг/мл), как и у здоровых доноров. Выявлена ассоциированность уровней MMP-7 с обоими показателями сигнального пути апоптоза – экспрессией CD 95+ лимфоцитов и sFas ( $r=0,32$ ,  $r=0,45$   $p \leq 0,03$ ), тог-

да как уровень MMP-3 только с последним ( $r= 0,31$ ,  $p \leq 0,003$ ). При этом значимые связи констатированы между всеми изучавшимися составляющими системы MMPs/TIMPs.

Согласно полученным результатам больных ТЛ характеризовала повышенная экспрессия CD95+, отражающая готовность к Fas-индуцированной гибели иммуноцитов, сочетающаяся с референтным уровнем апоптотической активности оцениваемой по величине sFasL, что согласуется с мнением о том, что повышение уровня мембранного антигена не обязательно сопровождается увеличением уровня его растворимой формы. Сохранение референтного уровня FasL возможно обусловлено отсутствием достаточного увеличения MMP-3 и MMP-7 способствующих его переходу в функционально активную sFasL. Отсутствие прямых связей TIMP-1 с маркерами сигнального пути апоптоза не исключает его опосредованный эффект на процесс за счет сбалансированности системы MMPs/ингибиторы.

**Выводы.** Анализ соотношений составляющих системы MMPs/ TIMPs с уровнями экспрессии CD95+ и растворимыми маркерами (sFas и sFasL) свидетельствует об участии MMPs (MMP-3 и MMP-7) в реализации сигнального пути апоптоза у больных ТЛ.