

вполне соответствует данным литературы. Чувствительность УЗДГ при критических стенозах и окклюзиях сонных артерий всегда выше, чем при малых и умеренно выраженных стенозах.

При верификации же ангиографических исследований с операционными данными полное совпадение с данными ангиографии составило 120 (86,3±2,9%) случаев. Переход из группы умеренно выраженных стенозов в критические стенозы при интраоперационной интерпретации составил 15 (10,8±2,6%) случаев из 19. 4 (2,8±1,3%) случая не совпали с протоколами ангиографии, по степени стенозы оказались умеренно выраженными. Это объясняется тем, что когда имеется плотная атеросклеротическая бляшка, расположенная по переднебоковой поверхности внутренней сонной артерии, создается экранирующий эффект с ложноположительной ангиографической оценкой [7].

Выводы

1. Ультразвуковая доплерография с дуплексным сканированием является безусловно методом скринингового исследования, ее неинвазивность и отсутствие противопоказаний к применению открывает ей широкие перспективы для ранней диагностики поражений сонных артерий и возможности динамического наблюдения за пациентами.

2. Сравнительный анализ результатов диагностики степеней стенозов сонных артерий методами ультразвуковой доплерографии с дуплексным

сканированием и ангиографии сонных артерий показал, что чувствительность доплерографии с дуплексным сканированием, оставаясь выше при критических стенозах (89,9%) и при окклюзии сонных артериях – 100%, при умеренно выраженных стенозах составила 68,7%, что свидетельствует, что ангиография сонных артерий является «золотым» стандартом в диагностике стенозов сонных артерий.

Литература

1. Аргунов В.А. Этнические особенности атеросклероза сонных артерий у населения г. Якутска и эволюция нарушений мозгового кровообращения за 20-летний период // Сибирский медицинский журнал. - 2005. - Т.20, №2. - С.10-11.
2. Argunov V.A. Ethnic features of carotids atherosclerosis in the population of Yakutsk and evolution of cerebral blood circulation disorders for - 20 years period // Siberian medical journal. - 2005. - V.20 №2. - P.10-11.
3. Бокерия Л.А. Болезни и врожденные аномалии системы кровообращения / Л.А.Бокерия, Р.Г.Гудкова // Сердечно-сосудистая хирургия. - М., 2008, НЦССХ им. А.Н.Бакулева РАМН. - С.135-138.
4. Bokerija L.A. Illnesses and congenital anomalies of system of blood circulation / L.A. Bokerija, R.G. Gudkova // Cardiovascular surgery.-Moscow.-2008 A.N. Bakulev's NCCVS of RAMS. P.135-138.
5. Драпкина О.М. Профилактика инсульта как заболевания, обусловленного атеросклерозом / О.М.Драпкина., Я.И.Ашихмин, В.Т.Ивашкин // Лечение нервных болезней. - М., 2007. - №2. - С.57-59.
6. Drapkina O.M. Stroke prophylaxis as atherosclerosis – related disease / O.M. Drapkina, J.I. Ashihmin, V.T. Ivashkin // Treatment of nervous diseases.-Moscow.-2007.-2.-P.57-59.
7. Захаров П.И. Хирургическое лечение критических стенозов сонных артерий / П.И. Захаров, А.К. Федосеева, Л.А. Попова, Н.П. Степанов // Современные проблемы сердечно-сосудистой патологии на Крайнем Севере. - Якутск, 2004. - С. 81-83.
8. Zaharov P.I. Surgical treatment of critical stenosis of carotids / P.I. Zaharov, A.K. Fedoseyeva, L.A. Popova, N.P. Stepanov // Modern problems of cardiovascular pathology on the Far North. - Yakutsk.-2004.-P. 81-83.
9. Николаева Т.Я. Ишемический инсульт в Восточно-Сибирском регионе: эпидемиология, факторы риска, клиничко-генетические и нейроиммунные механизмы: автореф. дис...-д-ра мед.наук / Т.Я. Николаева. - М., 2006. - С.5-6.
10. Nikolaeva T.J. Ischemic insult in the East-Siberian region: epidemiology, risk factors, clinico-genetic and neuroimmune mechanisms: autoref. dis. ... doc. med. scienc. / T.J. Nikolaeva.- M.-2006.-P.5-6.
11. Фокин А.А. Хирургическое лечение стенозирующих поражений сонных артерий по сравнительным результатам ультразвукового и ангиографического исследований / А.А. Фокин, А.В. Прык, Д.И. Алехин // Ангиология и сосудистая хирургия. - М., 2006. - №2. - С.85-89.
12. Fokin A.A. Surgical treatment of stenosing lesions of carotids by comparative results ultrasonic and angiographic researches / A.V. Pryk, D.I. Alehin // Angiology and vascular surgery. - M.-2006.-2.-P.85-89.
13. Шумилина М.В. Комплексная ультразвуковая диагностика патологии периферических сосудов / М.В. Шумилина: учеб.-метод. руководство. - М., НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, 2007. - С.109-120.
14. Shumilina M.V. Complex ultrasonic diagnostics of a pathology of peripheral vessels / Shumilina M.V. //Manual.-Moscow. A.N. Bakulev's NCCVS of Russian Academy of Medical Sciences.-2007.-P.109-120.

Л.И. Мордовская, В.А. Аксенова, М.А. Владимирский,
Т.И. Арефьева

АНТИГЕН-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ПЕРФОРИНА В ПОПУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ (CD8) Т-ЛИМФОЦИТОВ

УДК 616.24-002.5-053

В исследование включили 11 пациентов, инфицированных микобактериями туберкулеза (МБТ) в течение не более 2 лет при отсутствии рентгенологических признаков локального первичного туберкулеза, и 10 больных с впервые выявленным туберкулезом легких.

МОРДОВСКАЯ Лариса Ивановна – к.м.н., с.н.с. ГУ НПЦ «Фтизиатрия» МЗ РС (Я), limordovskaya@mail.ru; **АКСЕНОВА Валентина Александровна** – д.м.н., проф., гл. внештат. фтизиопедиатр РФ, руковод. лаб. НИИ фтизиопульмонологии ММА им. И.М. Сеченова, Москва; **ВЛАДИМИРСКИЙ Михаил Александрович** – д.м.н., проф., руковод. лаб. НИИ фтизиопульмонологии ММА, Москва, mvladimirskij@mail.ru; **АРЕФЬЕВА Татьяна Игоревна** – с.н.с., Российский кардиологический научно-производственный центр РАМН, Москва.

Иммунологическое исследование включало в себя определение популяционного состава лимфоцитов периферической крови, продукции мононуклеарами периферической крови перфорина до антибактериальной терапии. При индукции обоими антигенами PPD и ESAT-6 проценты цитотоксических (CD8) Т-лимфоцитов, продуцирующих перфорин, были значительно выше в группе больных активным туберкулезом легких, чем в группе инфицированных МБТ пациентов. Полученные результаты свидетельствуют о возможности дифференцирования латентной туберкулезной инфекции от активного процесса при анализе антиген-индуцированной популяции перфорин продуцирующих цитотоксических Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: дети, подростки, туберкулезное инфицирование, туберкулез легких, микобактериальные антигены, перфорин продуцирующие цитотоксические Т-лимфоциты.

11 patients infected with mycobacterium tuberculosis (MBT) within no more than 2 year term at absence of radiological attributes of local primary tuberculosis and 10 patients with for the first time revealed pulmonary tuberculosis were included into our research. During immunological research populational structure of peripheral blood lymphocytes and perforin production by

peripheral blood mononuclears before antibacterial therapy were defined. At an induction by both PPD and ESAT-6 antigens percents of cytotoxic (CD8) T-lymphocytes, producing perforin, were considerably higher in group of patients with active pulmonary tuberculosis, than in group of MBT infected patients. The received results testify to an opportunity of differentiation of a latent tubercular infection from active process at the analysis of antigen-induced population perforin producing cytotoxic T-lymphocytes.

Keywords: children, adolescents, tubercular infection, pulmonary tuberculosis, mycobacterium antigens, perforin producing cytotoxic T-lymphocytes.

Введение. Т-клетки способны вырабатывать молекулы, действующие на микобактерии напрямую: в тест-системе *in vitro* было показано, что Т-лимфоциты CD8+ человека, синтезирующие гранулизин и перфорин, обладают бактерицидной активностью в отношении микобактерий туберкулеза (МБТ) [3]. Противомикробный эффект гранулизина может обеспечиваться за счет активности перфорина, усиливающего эндоцитоз макрофагов или прорывающего поры в мембране макрофагов, в которых находятся микобактерии. CD8+ Т-лимфоциты, способные лизировать инфицированные микобактериями макрофаги с помощью лизирующих белков – перфорина и гранзимов, также могут синтезировать гамма-интерферон [1, 2, 4].

Целью нашей работы явилось сравнение содержания Т-лимфоцитов (CD3+), перфорин продуцирующих Т-лимфоцитов (CD3+ перфорин+), содержания CD3+ CD8+ и перфорин продуцирующих (CD8+ перфорин+) Т-лимфоцитов у инфицированных микобактериями туберкулеза и у больных туберкулезом легких детей и подростков.

Материалы и методы. В исследование включили 11 пациентов, инфицированных МБТ в течение не более 2 лет при отсутствии рентгенологических признаков локального первичного туберкулеза, и 10 больных с впервые выявленным туберкулезом легких. Из них 12 мальчиков и 9 девочек от 3 до 16 лет.

В структуре клинических форм преобладал инфильтративный туберкулез легких – 90,0% (9 чел.), очаговый туберкулез легких у 1 чел. (10,0%). Бактериовыделение определялось у 4 больных (40,0%). Наличие лекарственной устойчивости установлено у 1 чел. (10,0%).

Иммунизация детей вакциной БЦЖ является основным методом профилактики туберкулеза, защитный эффект которой зависит от качества проведенной прививки и оценивается по формированию поствакцинального знака. Вакцинация проведена всем детям и подросткам, 2 ребенка были ревакцинированы БЦЖ, рубчик малых размеров (1-3мм) определялся у 14,3% (3 чел.), отсутствовал рубчик у 4,8% (1 чел.).

Контакт с больным туберкулезом был выявлен у 5 (23,8%) заболевших детей и подростков, характер установленных контактов у всех больных был семейный. Сопутствующая патология представлена аллергиями – 14,3% (3 чел.), заболеваниями желудочно-кишечного тракта – 9,2% (2 чел.). Обследованные дети больше страдали частыми ОРВИ и заболеваниями носоглотки, верхних и нижних дыхательных путей.

При анализе чувствительности к туберкулину пробы Манту с 2ТЕ у 2 (20,0%) больных наблюдалась гиперэргическая чувствительность к туберкулину, у 1 (10,0%) – выраженная, у 4 (40,0%) – умеренно выраженная и у 3 (30,0%) – слабо выраженная чувствительность к туберкулину. У всех инфицированных МБТ детей наблюдалась слабо выраженная чувствительность к туберкулину (4 – 9 мм).

Иммунологическое исследование включало в себя определение популяционного состава лимфоцитов периферической крови, продукции мононуклеарами периферической крови перфорина до антибактериальной терапии. Образцы периферической венозной крови были взяты из локтевой вены утром натощак, в качестве антикоагулянта использовали гепарин (10 ед. на 1 мл крови) с согласия родителей.

Образцы крови были разлиты по 1 мл в три различные маркированные пробирки: контрольная проба без антигена и две опытные пробы, в которые вносили по 10 мкл туберкулина PPD (сухой очищенный туберкулин производства С.-Петербургского НИИ вакцин и сывороток) и специфический рекомбинантный антиген ESAT-6, полученный в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалея РАМН. Ампулу сухого очищенного туберкулина разводили 0,6 мл дистиллированной воды, что соответствовало концентрации по белку 1 мг/мл. Антиген ESAT-6 массой 32 кДа, полученный методом генной инженерии, содержал помимо специфического пептида 6 кДа целлюлозо-связывающий домен. Конечная концентрация обоих антигенов по белку составляла 10 мкг в мл крови. Образцы крови в стерильных пробирках

объемом 5 мл с герметично закрывающимися крышками инкубировали при 37°C в течение 20-24 часов. На следующий день определяли популяционный состав лимфоцитов периферической крови (CD3+, CD3+перфорин+, CD3+CD8+, CD8+перфорин+) с использованием моноклональных антител фирмы "Becton Dickinson" методом прямой иммунофлюоресценции. Анализ образцов осуществляли на проточном цитофлуориметре "FACSCalibur" той же фирмы.

Результаты и обсуждение. Общее процентное содержание Т-лимфоцитов (CD3+) у больных туберкулезом легких детей и подростков было достоверно ниже, чем у инфицированных МБТ ($69,6 \pm 0,9$ и $63,5 \pm 2,0$, соответственно, $p < 0,05$) (рис.1).

Проценты Т-лимфоцитов, продуцирующих перфорин (CD3+Per+), у инфицированных МБТ детей ($1,68 \pm 0,52$) и больных туберкулезом легких ($2,21 \pm 1,1$) значимо не отличались. Проценты перфорин продуцирующих Т-клеток в образцах крови, инкубированных с антигенами PPD и ESAT-6, были выше, чем в контроле без индукции антигенами в обеих группах; достоверные различия – с антигеном ESAT-6 (рис.2, а,б).

При анализе субпопуляции цитотоксических CD8+, продуцирующих перфорин, которые рассматриваются как важная субпопуляция клеток, обеспечивающих цитотоксический эффект в отношении инфицированных микобактериями макрофагов, а также прямой микробицидный эффект, было установлено, что в неиндуцированных антигенами образцах крови, несмотря

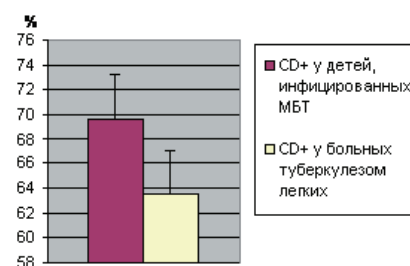


Рис.1. Процентное содержание Т-лимфоцитов (CD3+) у инфицированных МБТ и больных туберкулезом легких детей и подростков.

В табл.1-3 ДИ – доверительный интервал для 95% уровня достоверности

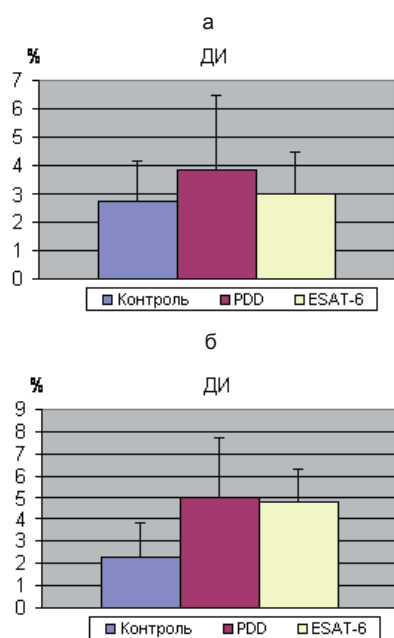


Рис.2. Проценты перфорин продуцирующих Т-клеток в образцах крови, инкубированных с антигенами PPD и ESAT-6 у детей, инфицированных МБТ (а), у больных туберкулезом легких (б)

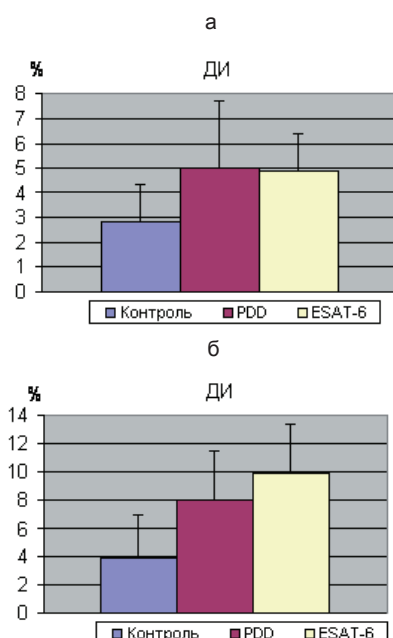


Рис.3. Проценты перфорин продуцирующих CD8+Per+ в образцах крови, инкубированных с антигенами PPD и ESAT-6 у детей, инфицированных МБТ (а), и у больных туберкулезом легких (б)

Таблица 1

Процентное содержание CD8 Т-клеток, продуцирующих перфорин (CD8⁺Per⁺)

Группы пациентов	% CD8 ⁺ Per ⁺ (контроль)	% CD8 ⁺ Per ⁺ Индукция PPD	% CD8 ⁺ Per ⁺ Индукция ESAT-6
Инфицированные МБТ n - 11	2,73±0,81	5,02±1,34	4,85±0,62
Больные туберкулезом легких n - 10	3,78±1,54	7,91±1,85	9,81±1,74
p	>0,05	>0,05	<0,05

Таблица 2

Сравнение Т-клеток, продуцирующих перфорин в антиген-индуцированных образцах крови у детей, инфицированных МБТ, и у больных туберкулезом легких (%)

Группы пациентов	% CD3 ⁺ Per ⁺ индукция PPD	% CD3 ⁺ Per ⁺ индукция ESAT-6
Инфицированные МБТ n - 11	2,305±0,99	1,58±0,4
Больные туберкулезом легких n - 10	2,70±0,54	2,66±0,49
p	>0,05	>0,05

Таблица 3

Сравнение субпопуляции CD8 Т-клеток, продуцирующих перфорин (CD8⁺Per⁺) в антиген-индуцированных образцах крови у детей, инфицированных МБТ, и больных туберкулезом легких (%)

Группы пациентов	% CD8 ⁺ Per ⁺ Индукция PPD	% CD8 ⁺ Per ⁺ Индукция ESAT-6
Инфицированные МБТ n - 11	1,69±0,74	2,29±0,63
Больные туберкулезом легких n - 10	4,13±0,62	5,06±0,78
p	P<0,01	P<0,01

на большее число этих клеток в группе больных, достоверных различий не показано.

Результаты изучения процентного содержания CD8⁺Т-клеток, продуцирующих перфорин (CD8⁺Per⁺), показаны в табл.1 и рис.3, а,б.

Как видно, значительное увеличение числа CD8⁺Per⁺ клеток наблюдается только при индукции антигеном ESAT-6.

Далее для анализа количества перфорин продуцирующих Т-лимфоцитов CD3⁺Per⁺ и CD8⁺Per⁺, индуцированных антигенами PPD и ESAT-6, мы из уровня процентного числа CD3⁺Per⁺ и CD8⁺Per⁺ клеток в индуцированных образцах вычитали число клеток в контроле (без антигена). После таких расчетов были получены данные, представленные в табл.2-3.

Как следует из данных последней таблицы, при индукции обоими антигенами PPD и ESAT-6 проценты цитотоксических (CD8) Т-лимфоцитов, продуцирующих перфорин, были значительно выше в группе больных активным туберкулезом легких, чем в группе инфицированных МБТ пациентов.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности дифференцирования латентной туберкулезной инфекции от активного процесса при анализе антиген-индуцированной популяции перфорин продуцирующих цитотоксических Т-лимфоцитов.

Литература

1. Human cytolytic and interferon-gamma-secreting CD8⁺ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis / Lalvani A. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – Vol. 95, №1. – P.270 – 275.
2. Recombinant early secreted antigen target 6 protein as a skin test antigen for the specific detection of Mycobacterium tuberculosis infection / Wu X. [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 2008. – Vol.152. – №1. – P. 81 – 87.
3. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor-α neutralizing agent/ Keane J. [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2001. – Vol. -345. – P. 1098 – 1104.
4. Woodworth J.S. Mycobacterium tuberculosis-specific CD8⁺ T cells require perforin to kill target cells and provide protection in vivo / Woodworth J. S., Wu Y., Behar S. M. J. // Immunol. – 2008. – Vol. 181, №12. – P. 8595 – 8603.