

АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ


М. А. Плеханова 

Кафедра педиатрии ДПО, Центр повышения квалификации и профессиональной переподготовки специалистов, Омский государственный медицинский университет, Омск

Клеточный иммунитет и цитокин интерферон гамма (ИФН- γ) имеют важное значение для формирования устойчивости организма к микобактериям туберкулеза (МБТ), но точный механизм появления иммунитета к туберкулезу (ТБ) неизвестен. В исследовании оценивали иммунный ответ при развитии ТБ и связь полиморфизма *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG* с выраженностью специфических иммунологических реакций у детей. Участниками исследования стали 310 детей до 18 лет, распределенные по 3 группам: группа ТБ — 110 детей с установленным по результатам комплексного обследования ТБ; группа ЛТИ — 156 детей с установленной латентной туберкулезной инфекцией; группа НТ — 44 ребенка, не инфицированные МБТ. Проводили иммунологические и молекулярно-генетические исследования, в частности, оценивали иммунный статус пациентов и распределение частот генотипов по изучаемому полиморфизму, в том числе в контексте эффективности вакцинирования против ТБ. Иммунный статус детей с ЛТИ характеризовался лишь слабо выраженной активацией клеточного иммунитета, а детей с ТБ — появлением у воспалительного процесса черт хронического за счет недостаточной функциональной активности клеток иммунной системы ($p < 0,05$). При оценке иммунного ответа по уровню синтеза ИФН- γ , индуцированного специфическими митогенами (PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a и ESAT6-CFP10), установили снижение ответа у больных ТБ, которое было ассоциировано с гетерозиготным генотипом по полиморфизму *rs2069705* гена *IFNG* ($p < 0,05$). При гомозиготных генотипах ТТ и СС ответ усиливался. Также установили, что низкая эффективность противотуберкулезной вакцинации также связана с гетерозиготным генотипом (50 %), а высокая — с генотипом, гомозиготным по аллелю Т (40 %), что может свидетельствовать о его протективной роли. Полученные результаты указывают на то, что изучаемый полиморфизм (гетерозиготный генотип) можно рассматривать в качестве маркера развития туберкулезной инфекции у детей.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, туберкулез, иммунный ответ, интерферон гамма, антиген, PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10, *IFNG*, полиморфизм, дети

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 16-16-55001.

 **Для корреспонденции:** Плеханова Мария Александровна
ул. Ленина, д. 12, г. Омск, 644099; dina-plus@mail.ru

Статья получена: 24.09.2017 **Статья принята к печати:** 25.10.2017

ADAPTIVE IMMUNITY AND GENETIC ASPECTS OF TUBERCULOSIS IN CHILDREN


Plekhanova MA 

Department of Pediatrics, Center of Continuing Professional Education and Retraining, Omsk State Medical University, Omsk, Russia

Cell-mediated immunity and the cytokine interferon gamma (IFN γ) have an important role in promoting host resistance against tuberculosis-causing mycobacteria (TBM), but the exact mechanism of developing immunity against tuberculosis (TB) is unknown. In this work we evaluate the immune response in TB and the association between *IFNG* gene polymorphism *rs2069705* (T-1488C) and the intensity of specific immune reactions in children. The study was conducted in 310 children below 18 years distributed into 3 groups: the TB group included 110 children with TB confirmed by medical evaluation; the LTB group consisted of 156 children with latent infection; and the NTB group was represented by 44 non-infected children. A few immunoassays and molecular-genetic tests were performed; specifically, we evaluated the immune status of patients and the distribution of genotypic frequencies of the studied polymorphism, in the context of previous vaccination against TB. The cell-mediated immune response was mild in children with LTB, while in children with TB inflammation showed signs of chronicity due to the lack of functional activity of immune cells ($p < 0.05$). We also measured IFN- γ synthesis induced by specific mitogens (PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a and ESAT6-CFP10), only to detect attenuation of the immune response in patients with TB, which was associated with the heterozygous *rs2069705* variant ($p < 0.05$). Children with homozygous TT and CC genotypes demonstrated a more pronounced immune response. Low effectiveness of the TB vaccine was shown to be associated with the heterozygous genotype (50 %), while its high effectiveness was associated with the homozygous T genotype (40 %), possibly indicating the protective role of the latter. Our findings suggest that the studied polymorphism (specifically, its heterozygous variant) can be a predictive marker of TB in children.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, tuberculosis, immune response, interferon gamma, antigen, PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10, *IFNG*, polymorphism, children

Funding: this work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Grant ID 16-16-55001).

 **Correspondence should be addressed:** Maria Plekhanova
ul. Lenina, d. 12, Omsk, Russia, 644099; dina-plus@mail.ru

Received: 24.09.2017 **Accepted:** 25.10.2017

Исследования последних лет установили важность клеточного иммунитета и интерферона гамма (ИФН- γ) для защиты организма человека от микобактерий туберкулеза (МБТ), но механизмы формирования иммунологической компетентности в отношении туберкулеза (ТБ) остаются малоизученными [1]. Известно, что пролиферации лимфоцитов, ответственных за продукцию ИФН- γ , способствуют белки, секретируемые МБТ на ранней стадии инфекции [2]. В ряде исследований было установлено, что у больных ТБ с нерезистентными генотипами по гену ИФН- γ (*IFNG*) уровень синтеза этого цитокина различен и коррелирует со степенью тяжести заболевания [3, 4].

Также ведется поиск генов-кандидатов при ТБ, вызывающих нарушения врожденного и адаптивного иммунитета [1, 5–9]. Ранее большое внимание уделялось роли полиморфизма гена *IFNG* в развитии различных заболеваний, в том числе туберкулеза [3, 10–13].

Изучение иммунологических и генетических факторов регуляции противотуберкулезного иммунитета позволит не только лучше понять основы патогенеза заболевания, но и оптимизировать подход к его профилактике. В работе изучали иммунный ответ при развитии ТБ и связь полиморфного варианта *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG* с выраженностью специфических иммунологических реакций у детей.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Проспективное исследование было проведено в 2014–2016 гг. В нем приняли участие 310 пациентов в возрасте до 18 лет, которые были разделены на 3 группы в зависимости от степени выраженности туберкулезной инфекции: 110 детей — с установленным ТБ (группа ТБ; средний возраст — $9,5 \pm 0,5$ года, каждый второй ребенок (46,6 %) — в возрасте до 8 лет); 156 детей — с латентной туберкулезной инфекцией (ЛТИ), установленной по результатам туберкулинодиагностики при исключении ТБ (группа ЛТИ; средний возраст — $6,6 \pm 0,3$ года, 70,5 % детей — в возрасте до 8 лет); 44 ребенка, не инфицированных МБТ (группа НТ; средний возраст — $3,1 \pm 0,4$ года, 95,5 % детей — в возрасте до 8 лет). Группы детей не различались по половому признаку ($p > 0,05$).

Всем детям были проведены специфические иммунологические исследования, 169 — также молекулярно-генетические. Сравнение данных об иммунном статусе провели только среди детей до 8 лет, чтобы сопоставление результатов было корректным.

Диагноз «туберкулез» ставили по итогам комплексного обследования, включавшего различные лабораторные, в том числе бактериологические, молекулярно-генетические, лучевые методы исследования. Учитывали результаты туберкулинодиагностики: пробы Манту с 2 туберкулиновыми единицами (ТЕ) туберкулина (PPD-L) и пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (АТР) с использованием «Диаскинтест» («Генериум», Россия), который содержит 0,2 мкг рекомбинантного белка CFP10–ESAT6. Диагноз подтверждался центральной врачебно-контрольной комиссией.

В группе ТБ у 23 детей установили инфильтративный туберкулез легких, у 38 — первичный туберкулезный комплекс, у 46 — туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (в одном случае сочетался с поражением верхнедолевого бронха слева), по одному случаю пришлось на очаговый и диссеминированный туберкулез легких и туберкулезный плеврит. В 4 случаях регистрировали сочетанное

поражение туберкулезом иных органов: периферических лимфатических узлов, плечевой кости, кишечника. Также в 4 случаях наблюдали осложненное течение туберкулезного процесса (ателектаз, экссудативный плеврит, легочная диссеминация, кровохарканье). У 60,9 % ($n = 67$) пациентов установили туберкулез в фазе инфильтрации, у 10,9 % ($n = 12$) — в фазе распада и обсеменения, у 0,9 % ($n = 1$) — уплотнения и рассасывания, у 26,4 % ($n = 29$) — в фазе кальцинации. Бактериовыделение зарегистрировали в 12 случаях (10,9%), из них в 6 — была установлена лекарственная устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам.

В группе ЛТИ у 75 детей установили ранний период первичной туберкулезной инфекции (РППТИ), а у 81 ребенка — инфицирование МБТ более одного года.

В группе НТ у 21 ребенка установили поствакцинальную аллергию, у 23 — положительную туберкулиновую анаergieю.

У детей, включенных в группу ТБ, средний размер инфильтрата по результатам туберкулинодиагностики (проба Манту) составил $12,6 \pm 0,4$ мм (95 % CI 11,8–13,5 мм), по результатам пробы с АТР — $14,95 \pm 0,5$ мм (95 % CI 13,9–16,0 мм). У детей в группе ЛТИ средние значения составили $10,3 \pm 0,3$ мм (95 % CI 9,7–10,9 мм) и $1,9 \pm 0,4$ мм (95 % CI 1,2–2,65 мм) соответственно. В группе НТ у детей с поствакцинальной аллергией средний размер инфильтрата по результатам пробы Манту составил $4,1 \pm 0,4$ мм (95 % CI 3,2–5,0 мм), при этом положительные реакции были отмечены в 9 случаях (42,9 %), в остальных — сомнительные. По результатам пробы с АТР у всех детей в этой группе регистрировали отрицательные реакции.

Мы располагали данными о противотуберкулезной вакцинации детей. Эффективность вакцинации оценивали по рубцу на месте введения вакцины БЦЖ (бацилла Кальметта–Герена; *bacillus Calmette–Guerin*, BCG) и реакции на туберкулин при проведении пробы Манту год спустя после прививки: при формировании рубца длиной 4–10 мм и положительной реакции на туберкулин вакцинацию рассматривали как эффективную, при отсутствии рубца и отрицательной реакции на туберкулин — как неэффективную, в остальных случаях — как малоэффективную. В группе ТБ были вакцинированы 108 детей (98,2 %), но эффективной вакцинация была только для 31 ребенка. В группе ЛТИ были привиты 155 детей (99,4 %), эффективно — большинство ($n = 97$). В группе НТ вакцину получили 36 детей (81,8 %), она была эффективной в каждом четвертом случае.

Иммунологические и молекулярно-генетические исследования проводили на базе Омского научно-исследовательского института природно-очаговых инфекций при поступлении пациента в специализированный стационар и постановке на учет в противотуберкулезном диспансере.

Для оценки иммунного статуса выполнили стандартные иммунологические скрининговые тесты I уровня: определение содержания в сыворотке крови иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM и IgE методом иммуноферментного анализа; оценку фагоцитарной активности нейтрофилов определением их способности поглощать инертные частицы латекса и тестированием с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) в двух вариантах теста — спонтанном и стимулированном; оценку субпопуляционного состава Т-клеток (CD) с использованием панели моноклональных антител (DAKO, Дания). Также определяли содержание спонтанно синтезируемого интерферона гамма и интерферона гамма, синтез которого был индуцирован в течение 72 ч специфическими

антигенами (PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a, ESAT6-CFP10), с использованием ИФА-тест-системы компании «Вектор-Бест» (Россия). Антигены были выделены в лаборатории трансляционной биомедицины отдела генетики и молекулярной биологии бактерий Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи (Москва) [14].

ДНК выделяли из сыворотки крови с помощью набора реагентов «ДНК-кровь» («ТестГен», Россия), идентификацию полиморфного маркера *rs2069705* гена *IFNG* в образцах проводили на амплификаторе iQ5 (BioRad, США) с использованием набора реагентов для полимеразной цепной реакции в модификации Flash («ТестГен») согласно инструкциям производителей. Генотипы анализировали в программном модуле «Дискриминация аллелей», поставляемом производителем амплификатора. Распределение частот генотипов проверяли на соответствие закону Харди–Вайнберга.

Минимальный размер выборки пациентов, достаточный для получения доказательных данных, был рассчитан в программе OpenEpi v3.0. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрических критериев Краскела–Уоллиса (H), Манна–Уитни (U) и χ^2 . Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Рассчитывали отношение шансов (odds ratio, OR): если шанс (риск) был выше 1, развитие заболевания считали статистически значимым. Полученные данные обрабатывали с использованием программ OpenEpi v3.0 и Statistica v6.0.

Исследование было одобрено этическим комитетом Омской государственной медицинской академии (протокол № 51 от 10.10.2012). Родители или их законные представители подписали добровольное информированное согласие на участие детей в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные сравнительного анализа результатов клинического и лабораторного обследования детей из групп ТБ и ЛТИ представлены в табл. 1. У детей с ЛТИ реже (9 %), чем у де-

тей с ТБ (19,1 %), регистрировали проявления интоксикационного синдрома ($p = 0,008$) и чаще — нарушения носового дыхания за счет аденоидных вегетаций (16 % против 1,8 %, $p = 0,00008$), очаги хронической инфекции (18,6 % против 10 %, $p = 0,027$), проявления респираторного аллергоза (15,4 % против 0 %, $p = 0,000008$) и избыточную массу тела (10,3 % против 4,5 %, $p = 0,044$). Для группы ТБ были значимыми такие клинические симптомы, как гепато- и спленомегалия (OR 2,583 и 3,800 соответственно) и дефицит массы тела (OR 1,898). По данным лабораторного исследования крови, также были значимыми анемия (OR 1,872), ускорение СОЭ (OR 2,255), лимфоцитоз (OR 1,634) и эозинофилия (OR 5,371). Важно отметить, что только в 4 случаях эозинофилии из 40 она была обусловлена паразитарными инвазиями.

Результаты оценки иммунного статуса всех детей, участвовавших в исследовании, представлены в табл. 2. Достоверных различий по иммунологическим показателям между детьми с ЛТИ и детьми, не инфицированными МБТ, не было ($p > 0,05$) за исключением содержания спонтанно синтезируемого ИФН- γ ($p < 0,05$). Для всех групп отмечено незначительное в сравнении с референсными значениями повышение содержания лейкоцитов, характеризующих клеточное звено иммунитета, что может свидетельствовать о его активации за счет неспецифических процессов. При этом достоверными были различия для CD16, HLA DR и спонтанно синтезируемого ИФН- γ . В группе ТБ наблюдали активацию гуморального звена иммунитета: повышение в пределах референсных значений содержания IgG, IgA и значительное повышение IgE — до $306,6 \pm 130,7$ МЕ/мл. Фагоцитарная активность клеток также значимо возросла, а резервные возможности нейтрофилов снизились. Для всех перечисленных показателей изменения были статистически значимыми при сравнении с результатами в группе НТ.

Таким образом, иммунный статус детей с ЛТИ не отличался от такового у детей, не инфицированных МБТ, при этом наблюдали слабо выраженную активацию клеточного иммунитета. В группе ТБ признаков, указывающих на

Таблица 1. Результаты клинико-лабораторного обследования детей с туберкулезом и латентной туберкулезной инфекцией

Признаки	Группа ТБ (n = 110), абс. (%)	Группа ЛТИ (n = 156), абс. (%)	Критерий χ^2 ; p-value	OR
Интоксикационный синдром	21 (19,1)	14 (9)	5,778; 0,008	2,393
Бронхолегочный синдром	10 (9,1)	12 (7,7)	0,166; 0,342	1,2
Параспецифические реакции	21 (19,1)	36 (23,1)	0,609; 0,218	0,787
Периферическая лимфаденопатия	18 (16,4)	19 (12,2)	0,943; 0,166	1,411
Гипертрофия небных миндалин I–II степени	26 (23,6)	42 (26,9)	0,366; 0,273	0,84
Аденоиды	2 (1,8)	25 (16)	14,28; 0,00008	0,097
Кариес	6 (5,5)	14 (9)	1,149; 0,143	0,585
Гепатомегалия	7 (6,4)	4 (2,6)	2,349; 0,063	2,583
Спленомегалия	10 (9,1)	4 (2,6)	5,512; 0,009	3,8
Очаги хронической инфекции	11 (10)	29 (18,6)	3,726; 0,027	0,487
Респираторный аллергоз	0	24 (15,4)	18,6; 0,000008	0
Дефицит массы тела	24 (21,8)	20 (12,8)	3,783; 0,026	1,898
Избыточная масса тела	5 (4,5)	16 (10,3)	2,894; 0,044	0,417
Анемия	16 (14,5)	13 (8,3)	2,563; 0,054	1,872
Увеличение СОЭ	25 (22,7)	18 (11,5)	5,959; 0,007	2,255
Лейкоцитоз	16 (14,5)	28 (17,9)	0,541; 0,231	0,778
Лимфоцитоз	43 (39,1)	44 (28,2)	3,473; 0,031	1,634
Моноцитоз	19 (17,3)	25 (16)	0,073; 0,394	1,094
Эозинофилия	40 (36,4)	15 (9,6)	28,14; <0,0000001	5,371

Таблица 2. Результаты иммунологического анализа крови детей с туберкулезом и латентной туберкулезной инфекцией и детей, не инфицированных МБТ

Показатель	Референсное значение	Группа ТБ		Группа ЛТИ		Группа НТ	
		n	M ± SEM	n	M ± SEM	n	M ± SEM
CD3, %	54–82	15	65,8 ± 1,3	16	66,2 ± 1,3	10	69,1 ± 1,7
CD3, абс.	1,65	15	1,8 ± 0,1	9	2,2 ± 0,3	8	2,1 ± 0,2
CD4, %	30–50	15	40,4 ± 1,5	16	39,0 ± 1,3	10	40,8 ± 1,0
CD4, абс.	0,92	15	1,1 ± 0,1	9	1,2 ± 0,15	8	1,2 ± 0,1
CD8, %	18–38	15	29,4 ± 1,4	16	26,9 ± 1,2	10	28,9 ± 1,4
CD8, абс.	0,6	15	0,8 ± 0,06	9	0,9 ± 0,15	8	0,9 ± 0,09
CD16, %	6–18	14	11,4 ± 0,5**	20	13,4 ± 0,6	10	17,1 ± 2,7
CD16, абс.	0,31	14	0,3 ± 0,03**	15	0,4 ± 0,04	10	0,6 ± 0,1
CD20, %	6–22	15	16,2 ± 1,5	12	16,8 ± 1,75	3	14,0 ± 1,2
CD20, абс.	0,2	15	0,5 ± 0,07	5	0,6 ± 0,1	-	-
HLA DR, %	14–25	15	25,9 ± 1,4**	20	23,7 ± 1,6	9	21,8 ± 1,1
HLA DR, абс.	0,33	15	0,7 ± 0,07	15	0,7 ± 0,09	9	0,7 ± 0,07
ИФН-γ спон., пг/мл	0,16–10	50	21,1 ± 5,7**	110	20,5 ± 3,0***	43	12,9 ± 1,7
IgG, г/л	8,12–16,14	19	11,7 ± 0,6*,**	110	9,7 ± 0,2	43	8,9 ± 0,3
IgA, г/л	0,75–3,17	19	1,6 ± 0,1*,**	110	1,2 ± 0,06	43	1,0 ± 0,08
IgM, г/л	0,69–3,00	19	1,4 ± 0,2	110	1,15 ± 0,05	43	1,2 ± 0,08
IgE, МЕ/мл	< 150	19	306,6 ± 130,7*	108	79,3 ± 12,6	23	81,9 ± 25,5
Фагоцитоз с латексом, %	52–95	15	68,5 ± 3,1**	107	65,7 ± 1,4	33	53,3 ± 2,7
НСТ-тест:							
– спонтанный, %	6–12	16	14,4 ± 1,9**	109	20,9 ± 1,3	41	24,4 ± 1,6
– стимулированный, %	–	16	37,8 ± 3,2**	109	46,5 ± 2,2	41	56,5 ± 3,3

Примечание. * — $p < 0,05$ при сравнении результатов в группе ТБ и группе ЛТИ (критерий Манна–Уитни, U); ** — $p < 0,05$ при сравнении результатов в группе ТБ и группе НТ (критерий Манна–Уитни, U); *** — $p < 0,05$ при сравнении результатов в группе ЛТИ и группе НТ (критерий Манна–Уитни, U).

развитие иммунодефицита, также не установили, однако отмеченные изменения характеризовали воспалительный процесс при ТБ у детей, в том числе приобретение им черт хронического процесса, в первую очередь за счет недостаточной функциональной активности клеток и недостаточной выработки интерферона гамма.

Для понимания вклада гена *IFNG* в механизм иммунологической защиты против МБТ мы исследовали его полиморфизм *rs2069705*. Среди детей с ТБ гетерозиготный генотип встречался в 51,9 % случаев, была установлена его ассоциация с заболеванием (OR 1,885; 95 % CI 1,019–3,487). Он встречался чаще среди детей как с вторичными (65 %), так и с первичными (47,5 %) формами туберкулеза, что позволяет говорить о высоком риске развития заболевания независимо от его генеза. Также установлена связь гетерозиготного генотипа с формированием инфильтратов (OR 1,737) с признаками деструкции (OR 1,458) легочной ткани, диссеминации (OR 1,75) и плеврального выпота (OR 1,9), с бактериовыделением (OR 1,458) и такими клиническими проявлениями туберкулеза, как параспецифические реакции (OR 2,059), периферическая лимфаденопатия (OR 2,4), дефицит массы тела (OR 1,429), гепато- и спленомегалия (OR 5,5), анемия (OR 2,059), повышение СОЭ (OR 3,4).

Учитывая ассоциацию полиморфизма *rs2069705* гена *IFNG* с адаптивным иммунитетом к туберкулезной инфекции, мы оценили эффективность вакцинации БЦЖ в контексте генотипов среди детей, у которых был установлен ранний период первичной туберкулезной инфекции ($n = 32$). В 12 случаях вакцинация была мало- или неэффективной, в половине из них у детей был гетерозиготный генотип. Вероятность низкой эффективности вакцинации составила 59,38 % (95 % CI 42,23–74,62 %). Среди детей,

у которых прививка была эффективной ($n = 20$), чаще регистрировали гомозиготный генотип по аллелю Т (40 %).

В исследованиях Д. С. Ожеговича [7] было установлено, что от полиморфизма T-1488С гена *IFNG* зависит уровень его экспрессии, поэтому мы предположили, что возможна связь изучаемых генотипов с уровнем синтеза интерферона гамма. При анализе содержания спонтанно синтезируемого ИФН-γ не было установлено значимых различий в зависимости от генотипа как среди детей с ЛТИ ($N = 1,663$; $p = 0,435$), так и с ТБ ($N = 4,810$; $p = 0,090$). Анализ содержания ИФН-γ, синтез которого был индуцирован специфическими антигенами [15], показал, что при развитии ТБ существует связь между генотипом и уровнем синтеза цитокина: при гетерозиготном генотипе содержание ИФН-γ под влиянием антигенов CFP32B, Rv2660c, ESAT6, Ag85a значимо снижалось (табл. 3). Учитывая это, мы также проанализировали частоту отрицательных результатов — отсутствие ответа на индукцию у детей, больных ТБ (табл. 4) — и определили связь с гетерозиготным генотипом. Подтвердилось наличие его ассоциации со снижением уровня синтеза ИФН-γ при индукции антигенами PPD-L, CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a и ESAT6-CFP10.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

У подавляющего большинства инфицированных МБТ людей отсутствуют симптомы туберкулеза, и, хотя они не являются заразными, есть риск развития активной формы ТБ. По оценкам экспертов, риск реактивации ТБ в течение жизни для пациента с ЛТИ составляет 5–10 %, причем чаще всего он реализуется в течение 5 лет с момента первичного инфицирования [16, 17]. Тем не менее, по мнению ряда исследователей, этот риск зависит от

Таблица 3. Уровень синтеза интерферона гамма, индуцированного специфическими антигенами, в зависимости от генотипа (полиморфного варианта *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG*) у детей, больных туберкулезом

Антиген	Полиморфный вариант <i>rs2069705</i> (T-1488C) гена <i>IFNG</i>		Критерий Манна-Уитни (U); p-value
	ТС	ТТ и СС	
	Me (Q25%; Q75%), n = 42	ME (Q25%; Q75%), n = 39	
PPD-L	1001,6 (698; 1200)	1380,7 (741,5; 1294,5)	703,5; 0,275
CFP32B	69,8 (10,2; 68)	95,8 (21; 122,5)	554,5; 0,018
Rv2660c	102,6 (12,2; 83)	149,6 (37,5; 195,5)	513; 0,006
ESAT6	101,5 (10,9; 57,4)	112,8 (26; 173)	523,5; 0,005
85a	65 (0,2; 40)	90,3 (6,5; 101)	549,5; 0,016
ESAT6-CFP10	440,4 (139; 761)	549,5 (187; 1133)	768; 0,630

Таблица 4. Частота отрицательных реакций на специфические антигены в зависимости от генотипа (полиморфного варианта *rs2069705* (T-1488C) гена *IFNG*) у детей, больных туберкулезом

Антиген	Полиморфный вариант <i>rs2069705</i> (T-1488C) гена <i>IFNG</i>				p-value	OR	95 % CI
	ТС (n = 42)		ТТ и СС (n = 39)				
	абс.	%	абс.	%			
PPD-L	3	7,1	1	2,6	0,202	2,923	0,291–29,35
ESAT6-CFP10	8	19	3	7,7	0,068	2,824	0,691–11,53
ESAT6	40	95,2	24	61,5	0,0001	12,5	2,628–59,47
Rv2660c	37	88,1	30	76,9	0,092	2,22	0,672–7,33
CFP32B	34	81	19	48,7	0,0012	4,474	1,656–12,08
85a	34	81	19	48,7	0,0012	4,474	1,656–12,08

нескольких факторов, наиболее важным из которых является иммунный статус организма [18–21]. Результаты нашего исследования позволяют говорить о наличии специфического воспалительного процесса и отсутствии вторичного иммунодефицита.

Мы изучали ИФН- γ , основная функция которого — иммунорегуляция, включая активацию макрофагов, усиление Th-1-опосредованного ответа, индукцию экспрессии антигенов MHC типа II на антигенпрезентирующих клетках и др. [22]. При активации клеточного иммунитета продуцентами ИФН- γ являются активированные Th1-лимфоциты (основной активационный маркер — HLA DR) и натуральные клетки-киллеры (CD16), следовательно, наблюдаемое в нашем исследовании снижение количества NK-клеток (natural killer cells, NK cells) при ТБ могло привести к снижению уровня синтеза цитокина, а недостаток ИФН- γ мог стать причиной сниженной активности цитотоксических клеток. Этим можно объяснить факт повышения содержания спонтанно синтезируемого ИФН- γ еще при ЛТИ ($p < 0,05$), при этом можно предположить, что антигенная нагрузка не создавала условия для гиперактивации клеточного ответа. В период развития ТБ этот показатель оставался на уровне, характерном для ЛТИ ($p > 0,05$). Учитывая повышенное содержание спонтанно синтезируемого ИФН- γ , можно было бы предположить, что содержание IgE будет невысоким, т. к. ИФН- γ , будучи продуктом Th1-лимфоцитов, ингибирует пролиферацию Th2-лимфоцитов и индуцированное IL4 переключение синтеза Ig на IgE, а вместо этого способствует синтезу IgG2 [23]. Однако в нашем случае при развитии ТБ был отмечен высокий уровень синтеза IgE, и это может свидетельствовать о недостаточной продукции ИФН- γ и формировании хронического воспаления. Рядом исследователей установлена прямая связь между возникновением очагов хронической бактериальной или грибковой инфекции и гиперпродукцией IgE [24–26].

ИФН- γ также рассматривается как важнейший фактор активации макрофагов [22]. Макрофаги лизируют МБТ,

обеспечивая антимикобактериальную защиту, в том числе через регуляцию синтеза про- и противовоспалительных цитокинов [27, 28]. Однако каков баланс клеток и медиаторов, необходимых для уничтожения МБТ и предотвращения патологии легких, до конца неясно, этот вопрос изучается [29]. В нашем исследовании отмечено снижение фагоцитарной активности клеток (снижение резервных возможностей нейтрофилов) при развитии ТБ, что также может свидетельствовать о недостаточной продукции ИФН- γ .

В работах М. М. Авербаха высказывалась гипотеза о существовании в лимфоцитах генов, контролирующих активацию клеток, синтезирующих медиаторы, и депрессии одного участка генома при депрессии другого участка, что может нарушать межклеточное взаимодействие при ТБ [30]. Исследователи пытаются установить генетические факторы риска ТБ [8, 9], в том числе активно изучают ген *IFNG*, который связан с продукцией цитокина ИФН- γ [3, 9] и полиморфизм T-1488C которого влияет на синтез регуляторного белка [7]. В нашем исследовании маркером высокого риска развития ТБ являлся его гетерозиготный генотип по изучаемому генетическому локусу (OR 4,667, 95 % CI 1,236–17,62; $p = 0,008$), при этом — как при первичном, так и вторичном по генезу варианте заболевания. Косвенным показателем этого является и низкая эффективность вакцинации БЦЖ, установленная в группе детей в ранний период первичной туберкулезной инфекции. Некоторые исследователи также рассматривают низкую эффективность прививки как фактор риска развития ТБ [18, 31]. Было также определено, что изучаемый полиморфизм гена *IFNG* (гетерозиготный генотип) ассоциирован с иммунным ответом против отдельных микобактериальных антигенов при развитии ТБ: отметили значительное снижение ответа на белки ранней стадии развития туберкулезной инфекции — CFP32B, Rv2660c, ESAT6, 85a [15] и незначительное снижение уровня синтеза ИФН- γ при индукции PPD-L и ESAT6-CFP10, что еще раз подчеркивает

важность оценки данных антигенов для ТБ. Также была определена протективная роль гомозиготного генотипа по аллелю T и его связь с формированием противотуберкулезного иммунитета у детей.

Таким образом, результаты исследования позволяют рассматривать полиморфизм гена *IFNG* (T-1488C) в качестве дополнительного генетического фактора риска развития туберкулезной инфекции у детей и одной из причин недостаточной функциональной активности клеток, регулирующих синтез ИФН-γ.

ВЫВОДЫ

Оценивая иммунный ответ при развитии туберкулезной инфекции, установили активацию клеточного звена имму-

нитета, а при ее прогрессировании (от латентной к активной) недостаточную функциональную активность клеток. В качестве основного цитокина адаптивного иммунитета рассматривали ИФН-γ.

Выявлена связь полиморфизма T-1488C гена *IFNG* с выраженностью специфических иммунологических реакций. Гетерозиготный генотип связан с недостаточной продукцией цитокина на белки ранней стадии развития туберкулезной инфекции. Гомозиготный генотип по аллелю T — с формированием протективного иммунитета.

Установлено, что гетерозиготный генотип полиморфного варианта гена *IFNG* (*rs2069705*) связан с развитием туберкулеза у детей с ЛТИ, что позволяет данный генотип рассматривать в качестве дополнительного фактора риска заболевания.

Литература

- Abel L, El-Baghdadi J, Bousfilha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2014 May 12; 369 (1645): 20130428.
- Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol*. 2004 Nov; 12 (11): 500–8.
- Никулина Е. Л., Наследникова И. О., Уразова О. И., Воронкова О. В., Новицкий В. В., Некрасов Е. В. и др. Аллельный полиморфизм гена *IFNγ* при туберкулезе легких. *Мед. иммунол*. 2010; 12 (3): 259–64.
- Поспелов А. Л. Роль мутаций некоторых генов естественного и приобретенного иммунитета в течении впервые выявленного туберкулеза у детей и подростков [автореф. диссертации]. М.: Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского; 2011. 24 с.
- Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med*. 2005 Dec 19; 202 (12): 1617–21.
- Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live *Mycobacterium tuberculosis*-, *M. bovis* BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Jul; 16 (7): 991–8.
- Ожегова Д. С. Функциональная вариабельность генов подверженности инфекционным заболеваниям [автореф. диссертации]. Томск: Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ; 2009. 21 с.
- El Baghdadi J, Grant AV, Sabri A, El Azbaoui S, Zaidi H, Cobat A, et al. [Human genetics of tuberculosis]. *Pathol Biol (Paris)*. 2013 Jan; 61 (1): 11–6. French.
- Cliff JM, Kaufmann SH, McShane H, van Helden P, O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunol Rev*. 2015 Mar; 264 (1): 88–102.
- Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med*. 1996 Dec 26; 335 (26): 1956–61.
- Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect*. 2004 Aug; 6 (10): 946–59.
- Рыдловская А. В., Симбирцев А. С. Функциональный полиморфизм гена *TNFγ* и патология. Цитокины и воспаление. 2005; 4 (3): 4–10.
- Симбирцев А. С., Громова А. Ю. Функциональный полиморфизм генов регуляторных молекул воспаления. Цитокины и воспаление. 2005; 4 (1): 3–10.
- Плеханова М. А. (RU), Пацула Ю. И. (RU), Аксенова В. А. (RU), Кривцова Л. А. (RU), Лунин В. Г. (RU), Ткачук А. П. (RU) и др., авторы; Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи (RU), патентообладатель. Способ оценки активности туберкулезной инфекции у детей и подростков. Патент РФ RU 2586279. 10 июня 2016 г.
- Плеханова М. А. Влияние специфических белков микобактерии туберкулеза на иммунный ответ у детей. *Вопр. практ. педиатр*. 2017; 12 (3): 19–25.
- Barry CE 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2009 Dec; 7 (12): 845–55.
- Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog*. 2012; 8 (5): e1002607.
- Русских Н. Ю. Факторы риска развития туберкулеза и особенности клинического течения заболевания у детей и подростков из социально-дезадаптированных семей [автореф. диссертации]. М.: Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза; 2008. 30 с.
- Кузьмина И. К. Значение гиперергической чувствительности к туберкулину в диагностике туберкулеза органов дыхания и формировании групп риска у детей и подростков [автореф. диссертации]. М.: Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза; 2009. 28 с.
- Бородулин Б. Е., Васнёва Ж. П., Ахмерова Т. Е. Субпопуляционная структура и функциональные особенности CD4⁺-лимфоцитов у детей с положительными кожными туберкулиновыми пробами. *Туберк. и бол. легких*. 2013; 90 (6): 19–20.
- de Martino M, Galli L, Chiappini E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? *BMC Infect Dis*. 2014; 14 Suppl 1: S1.
- Кетлинский С. А., Симбирцев А. С. Цитокины. СПб.: Фолиант; 2008. 552 с.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, редакторы. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4-е изд. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2006. 2448 с.
- Балаболкин И. И., Гребенюк В. Н. Атопический дерматит у детей. М.: Медицина; 1999. 240 с.
- Смирнова Г. И. Аллергодерматозы у детей. М.: БУК Лтд; 1998. 299 с.
- Торопова Н. П., Синявская О. А. Экзема и нейродермит у детей. Современные представления о патогенезе, клинике, лечении и профилактике. Екатеринбург: Уральский рабочий; 1993. 446 с.
- Dey B, Bishai WR. Crosstalk between *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell. *Semin Immunol*. 2014 Dec; 26 (6): 486–96.
- Rajaram MVS, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol*. 2014 Dec; 26 (6): 471–85.
- Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol*. 2011 May; 4 (3): 271–8.

30. Авербах М. М., редактор. Иммунология и иммунопатология туберкулеза. М.: Медицина; 1976. 311 с.
31. Касимцева О. В. (RU), Овсянкина Е. С. (RU), авторы; Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза

(RU), патентообладатель. Способ оценки эпидемической опасности очага туберкулезной инфекции для контактных детей и подростков. Патент РФ RU 2307594. 10 октября 2007 г.

References

1. Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova JL, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2014 May 12; 369 (1645): 20130428.
2. Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, Cole ST, Brosch R. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol.* 2004 Nov; 12 (11): 500–8.
3. Nikulina EL, Naslednikova IO, Urazova OI, Voronkova OV, Novitsky VV, Nekrasov EV, et al. [Allelic polymorphism of IFN γ gene in patients with pulmonary tuberculosis]. *Meditinskaya immunologiya.* 2010; 12 (3): 259–64. Russian.
4. Pospelov AL. Rol' mutatsiy nekotorykh genov estestvennogo i priobretennogo immuniteta v techenii vpervye vyavlennoy tuberkuleza u detey i podrostkov [abstract of the dissertation]. Moscow: Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy institut epidemiologii i mikrobiologii im. G. N. Gabrichevskogo; 2011. 24 p. Russian.
5. Alcais A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL. Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases. *J Exp Med.* 2005 Dec 19; 202 (12): 1617–21.
6. Hasan Z, Jamil B, Ashraf M, Islam M, Dojki M, Irfan M, et al. Differential live Mycobacterium tuberculosis-, M. bovis BCG-, recombinant ESAT6-, and culture filtrate protein 10-induced immunity in tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Jul; 16 (7): 991–8.
7. Ozhegova DS. Funktsional'naya variabel'nost' genov podverzhennosti infektsionnym zabolevaniyam [abstract of the dissertation]. Tomsk: Research Institute of Medical Genetics of Tomsk NRMС; 2009. 21 p. Russian.
8. El Baghdadi J, Grant AV, Sabri A, El Azbaoui S, Zaidi H, Cobat A, et al. [Human genetics of tuberculosis]. *Pathol Biol (Paris).* 2013 Jan; 61 (1): 11–6. French.
9. Cliff JM, Kaufmann SH, McShane H, van Helden P, O'Garra A. The human immune response to tuberculosis and its treatment: a view from the blood. *Immunol Rev.* 2015 Mar; 264 (1): 88–102.
10. Jouanguy E, Altare F, Lamhamed S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-gamma-receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med.* 1996 Dec 26; 335 (26): 1956–61.
11. Quesniaux V, Fremont C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, et al. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect.* 2004 Aug; 6 (10): 946–59.
12. Rydlovskaya AV, Simbirtsev AS. [TNF γ functional gene polymorphism and pathology]. *Tsitokiny i vospalenie.* 2005; 4 (3): 4–10. Russian.
13. Simbirtsev AS, Gromova AYU. [Functional gene polymorphisms of the molecules regulating inflammation]. *Tsitokiny i vospalenie.* 2005; 4 (1): 3–10. Russian.
14. Plekhanova MA (RU), Patsula Yul (RU), Aksenova VA (RU), Krivtsova LA (RU), Lunin VG (RU), Tkachuk AP (RU), et al, inventors; N. F. Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology (RU), assignee. Sposob otsenki aktivnosti tuberkuleznoy infektsii u detey i podrostkov. Russian Federation patent RU 2586279. 2016 Jun 10. Russian.
15. Plekhanova MA. [Influence of mycobacterium tuberculosis-specific proteins on immune response in children]. *Voprosy prakticheskoy pediatrii.* 2017; 12 (3): 19–25. Russian.
16. Barry CE 3rd, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrh S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009 Dec; 7 (12): 845–55.
17. Ottenhoff TH, Kaufmann SH. Vaccines against tuberculosis: where are we and where do we need to go? *PLoS Pathog.* 2012; 8 (5): e1002607.
18. Russkikh NYu. Faktory riska razvitiya tuberkuleza i osobennosti klinicheskogo techeniya zabolevaniya u detey i podrostkov iz sotsial'no-dezadaptirovannykh semey [abstract of the dissertation]. Moscow: Central Tuberculosis Research Institute; 2008. 30 p. Russian.
19. Kuz'mina IK. Znachenie giperergicheskoy chuvstvitel'nosti k tuberkulinu v diagnostike tuberkuleza organov dykhaniya i formirovaniy grupp riska u detey i podrostkov [abstract of the dissertation]. Moscow: Central Tuberculosis Research Institute; 2009. 28 p. Russian.
20. Borodulin BE, Vasneva ZhP, Akhmerova TE. Subpopulyatsionnaya struktura i funktsional'nye osobennosti CD4⁺-limfotsitov u detey s polozhitel'nymi kozhnymi tuberkulinovymi probami. *Tuberkulez i bolezni legkikh.* 2013; 90 (6): 19–20. Russian.
21. de Martino M, Galli L, Chiappini E. Reflections on the immunology of tuberculosis: will we ever unravel the skein? *BMC Infect Dis.* 2014; 14 Suppl 1: S1.
22. Ketlinskiy SA, Simbirtsev AS. *Tsitokiny.* St Petersburg: Foliant; 2008. 552 p. Russian.
23. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 4th ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2006. 2448 p.
24. Balabolkin II, Grebenyuk VN. *Atopicheskiy dermatit u detey.* Moscow: Meditsina; 1999. 240 p. Russian.
25. Smirnova GI. *Allergodermatozy u detey.* Moscow: BUK Ltd; 1998. 299 p. Russian.
26. Toropova NP, Sinyavskaya OA. *Ekzema i neyrodermit u detey. Sovremennye predstavleniya o patogeneze, klinike, lechenii i profilaktike.* Ekaterinburg: Ural'skiy rabochiy; 1993. 446 p. Russian.
27. Dey B, Bishai WR. Crosstalk between Mycobacterium tuberculosis and the host cell. *Semin Immunol.* 2014 Dec; 26 (6): 486–96.
28. Rajaram MVS, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol.* 2014 Dec; 26 (6): 471–85.
29. Flynn JL, Chan J, Lin PL. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. *Mucosal Immunol.* 2011 May; 4 (3): 271–8.
30. Averbakh MM, editor. *Immunologiya i immunopatologiya tuberkuleza.* Moscow: Meditsina; 1976. 311 p. Russian.
31. Kasimtseva OV (RU), Ovsyankina ES (RU), inventors; Central Tuberculosis Research Institute (RU), assignee. Sposob otsenki epidemicheskoy opasnosti ochaga tuberkuleznoy infektsii dlya kontaktnykh detey i podrostkov. Russian Federation patent RU 2307594. 2007 Oct 10. Russian.