

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИГЕН–СТИМУЛИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ Υ–ИНТЕРФЕРОНА *EX VIVO* В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АКТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

З.М. Загдын¹, А.А. Луцкий², А.А. Жирков², О.А. Макаренко², Д. Феррара^{3,4,5,6},
Р. Аксельсон-Робертсон³, И. Мегелес⁴, Н.А. Скрынник⁷, В.Н. Шабалин⁸, Х.Н. Джумаева⁸,
М. Мейер^{3,4,6}, С.В. Сидоренко², Ю.В. Лобзин²

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург

² Научно-исследовательский институт детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург

³ Центр трансплантации аллогенных стволовых клеток, Каролинский университетский госпиталь, Стокгольм, Швеция

⁴ Департамент микробиологии, опухолевой и клеточной биологии, Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

⁵ Университет Перуджии, Перуджия, Италия

⁶ Отделение терапевтической иммунологии, департамента лабораторной медицины, Каролинский университет, Стокгольм, Швеция

⁷ Противотуберкулезный диспансер № 12, Санкт-Петербург

⁸ Зеленохолмская туберкулезная больница, Зеленый холм, Ленинградская область

Antigen induced production of Υ-interferon *ex vivo*, in the peripheral blood of patients with active pulmonary tuberculosis

Z.M. Zagdyn¹, A.A. Lutskiy², A.A. Zhirkov², O.A. Makarenko², D. Ferrara^{3,4,5,6}, R. Axelsson-Robertson³, I. Magalhaes⁴,
N.A. Skrynnik⁷, V.N. Shabalin⁸, H.N. Dzhumayeva⁸, M. Maeurer^{3,4,6}, S.V. Sidorenko², Yu.V. Lobzin²

¹ Saint-Petersburg Science Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint-Petersburg

² Science Research Institute of Children's Infections, Saint-Petersburg

³ Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

⁴ Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska University, Stockholm, Sweden

⁵ University of Perugia, Perugia, Italy

⁶ Division Therapeutic Immunology, Karolinska University, Stockholm, Sweden

⁷ Saint-Petersburg Regional Antituberculosis Dispensary №12, Saint-Petersburg

⁸ Zeleniy Holm Tuberculosis hospital, Zeleniy holm, Leningrad Region

Резюме. Туберкулез является одной из наиболее серьезных проблем российского здравоохранения. Россия остается в списке из 22 стран с высокой заболеваемостью туберкулезом и на 3-м месте в мире по распространенности лекарственно-устойчивых форм заболевания. Требуется разработка как новых методов диагностики, так и эффективных мер специфической профилактики, включая новые вакцины, для создания которых необходимо знание наиболее иммуногенных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*. В данной работе исследовалась продукция интерферона-γ в цельной крови пациентов с активным туберкулезом в ответ на антиген-стимуляцию различными белками *Mycobacterium tuberculosis*. Результаты исследования позволили дать оценку иммуногенности ранее изученных белков (Ag85a и ESAT-6) в сравнении с недавно идентифицированными белками (Rv2957, Rv2958c и Rv0447) с одновременным изучением их отношений к туберкулину и антигенам различных вирусов (вирус иммунодефицита человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна – Барр, вирус гриппа). Белок Rv2958c, в отличие от белка ESAT-6, показал большую иммуногенность при сравнении с туберку-

Abstract. Tuberculosis (TB) is one of the most significant problems in the Russian Health Care. Russia remains on the list of the 22 countries with a high TB incidence and on the third place in the world with a high prevalence of Drug Resistant TB [1]. It is urgently needed to develop new TB diagnostic methods as well as effective measures of the specific TB prevention, including a development of the novel vaccines, so we have to know better about the most immunogenic antigens of *Mycobacterium Tuberculosis*. We studied the Interferon-γ production in the whole blood after stimulating immune response with different proteins of *Mycobacterium Tuberculosis* in patients with active TB. The study results permitted us to evaluate the immunogenicity of the previously known proteins (Ag85a and ESAT-6) in comparison to the recently identified ones (Rv2957, Rv2958c and Rv0447), analyzing simultaneously their relation to tuberculin, as well as to antigens of the different viruses (Human Immunodeficiency Virus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, Influenza Virus). Protein Rv2958c, unlike protein ESAT-6, showed the high immunogenicity in comparison to tuberculin. The expressed immunogenicity of protein Rv2958c

лином. Выраженная иммуногенность белка Rv2958с может свидетельствовать о возможно большей специфичности иммунного ответа на этот антиген у больных туберкулезом. Между тем бактериовыделение было ассоциировано с достоверно низким иммунным ответом на данный белок. Также выявлены статистические различия в иммунореактивности пациентов к различным антигенам *Mycobacterium tuberculosis* в зависимости от наличия или отсутствия лекарственной устойчивости возбудителя. Представляет интерес достоверно низкая иммунореактивность пациентов с лекарственно-устойчивым туберкулезом в отношении белка pp65 CMV.

Ключевые слова: туберкулез, лекарственно-устойчивый туберкулез, продукция интерферона гамма, специфический иммунный ответ, туберкулез и вирусные инфекции.

Введение

Несмотря на имеющуюся в последние годы тенденцию к стабилизации эпидемической ситуации по туберкулезу (ТБ), Россия продолжает оставаться в списке из 22 стран с высокой заболеваемостью и на 3-м месте в мире — по распространенности лекарственно-устойчивых форм заболевания [1]. По имеющимся данным, в 2012 г. в Российской Федерации заболеваемость туберкулезом составила 68,1 на 100 тыс., смертность от ТБ — 12,4 на 100 тыс., общая распространенность инфекции — 157,7 на 100 тыс., распространенность ТБ с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) — 24,3 на 100 тыс. населения. Растет доля лиц с ВИЧ-положительным статусом, которая в 2012 г. составила 10,3% от всех больных активным туберкулезом, увеличившись в 1,6 раз в сравнении с 2009 г. (6,3%). При этом туберкулез активно выявляется лишь в 50–60% случаев, и эффективность лечения по критерию прекращения бактериовыделения в когорте впервые выявленных больных остается ниже 80%, среди контингентов — чуть более 40%. Таким образом, туберкулез является одной из наиболее серьезных проблем российского здравоохранения.

Диагностика туберкулеза, в особенности внелегочных локализаций и у иммунокомпрометированных лиц (ВИЧ-инфекция, прием иммуноориентированных средств и т.д.), становится трудной в связи со стертой классических клинических проявлений заболевания, атипичностью рентгенологической картины и олигобациллярностью таких пациентов. Применяемая проба с туберкулином зачастую дает ложноположительные результаты в связи с БЦЖ-вакцинацией на уровне популяции, ложноотрицательные и/или искаженные результаты у пациентов с тяжелым иммунодефицитом [2]. Относительно новые иммунодиагностические методы, такие как QuantiFERON GOLD in Tubes (Q-GIT), по данным российских исследователей, демонстрируют достаточно низкую эффектив-

ность [3] из-за высокой инфицированности населения туберкулезом и широкой распространенности специфической профилактики вакциной БЦЖ. До настоящего времени в России рутинно продолжается применение ревакцинации БЦЖ. При этом влияние вакцинации и ревакцинации БЦЖ, в сочетании с последующим инфицированием ТБ, на продукцию интерферона гамма (ИФН) в Q-GIT, который имеет один общий антиген (АГ) с вакциной БЦЖ (ТВ7.7), несмотря на отсутствие у неё двух других антигенов ИФН (CFP10 и ES-AT-6), не изучалось. Кроме того, формирование специфического клеточного иммунного ответа на АГ *Mycobacterium tuberculosis* (MT) зависит от множества факторов: течения латентного туберкулеза, который на протяжении всей жизни может оставаться скрытым или же перейти в активную форму, повторного инфицирования MT, особенно лекарственно-устойчивыми (ЛУ) штаммами, инфицирования другими патогенами (вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна — Барр (ВЭБ) и др.), сопутствующих неинфекционных заболеваний и других причин. Следовательно, существует необходимость в создании новых, эффективных и доступных в широком масштабе иммунологических методов диагностики и специфической профилактики туберкулеза, разработка которых требует знания наиболее иммуногенных эпитопов антигенов MT [4]. Ранее проведенный скрининг протеинов MT позволил идентифицировать иммуногенные аминокислотные последовательности, которые стали кандидатами для дальнейшего изучения в популяции пациентов с активным легочным туберкулезом, как лекарственно-устойчивым, так и лекарственно чувствительным [5]. Исследования продукции ИФН с целью диагностики ТБ были успешно проведены в различных европейских странах с низкой заболеваемостью туберкулезом и отсутствием массовой вакцинации БЦЖ. Представляет интерес оценка диагностических

Key words: tuberculosis, drug resistant tuberculosis, Y-interferon production, specific immune response, tuberculosis and virus co-infections.

ность [3] из-за высокой инфицированности населения туберкулезом и широкой распространенности специфической профилактики вакциной БЦЖ. До настоящего времени в России рутинно продолжается применение ревакцинации БЦЖ. При этом влияние вакцинации и ревакцинации БЦЖ, в сочетании с последующим инфицированием ТБ, на продукцию интерферона гамма (ИФН) в Q-GIT, который имеет один общий антиген (АГ) с вакциной БЦЖ (ТВ7.7), несмотря на отсутствие у неё двух других антигенов ИФН (CFP10 и ES-AT-6), не изучалось. Кроме того, формирование специфического клеточного иммунного ответа на АГ *Mycobacterium tuberculosis* (MT) зависит от множества факторов: течения латентного туберкулеза, который на протяжении всей жизни может оставаться скрытым или же перейти в активную форму, повторного инфицирования MT, особенно лекарственно-устойчивыми (ЛУ) штаммами, инфицирования другими патогенами (вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), цитомегаловирус (ЦМВ), вирус Эпштейна — Барр (ВЭБ) и др.), сопутствующих неинфекционных заболеваний и других причин. Следовательно, существует необходимость в создании новых, эффективных и доступных в широком масштабе иммунологических методов диагностики и специфической профилактики туберкулеза, разработка которых требует знания наиболее иммуногенных эпитопов антигенов MT [4]. Ранее проведенный скрининг протеинов MT позволил идентифицировать иммуногенные аминокислотные последовательности, которые стали кандидатами для дальнейшего изучения в популяции пациентов с активным легочным туберкулезом, как лекарственно-устойчивым, так и лекарственно чувствительным [5]. Исследования продукции ИФН с целью диагностики ТБ были успешно проведены в различных европейских странах с низкой заболеваемостью туберкулезом и отсутствием массовой вакцинации БЦЖ. Представляет интерес оценка диагностических

возможностей подобных тестов среди российской популяции.

Цель исследования — изучение иммуногенности различных антигенов *MT* у больных активным туберкулезом, поступивших в стационары Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Была выбрана широкая панель АГ возбудителя. Одна часть этих панелей представлена внутриклеточно экспрессируемыми АГ у медленно растущих *MT* (Rv2957, Rv2958 и Rv0447c), другая часть — как достаточно изученные секретируемые АГ, экспрессируемые у быстро пролиферирующих *MT* (Ag85a и ESAT-6). В исследовании для сравнительной оценки выраженности антиген-стимулируемого специфического иммунного ответа на каждый используемый АГ как среди всех пациентов, так и среди различных подгрупп участников, использовался тест на продукцию ИФН в цельной крови. Этот тест при относительной простоте выполнения позволяет более достоверно оценить иммунологический статус *ex vivo* в сравнении с методикой работы с выделенными лимфоцитами [6, 7].

Материалы и методы

В исследование были включены 52 человека с подтвержденным диагнозом активного туберкулеза, поступившие в специализированные противотуберкулезные учреждения Санкт-Петербурга и Ленинградской области в период с августа 2011 г. по октябрь 2012 г. Все участники исследования соответствовали критериям включения: были в возрасте от 18 до 60 лет, имели впервые выявленный туберкулез или рецидив заболевания с изолированным поражением органов дыхания или с его сочетанием с экстраторакальными локализациями. Установление диагноза ТБ основывалось на результатах клинических, лучевых, включая компьютерную и магнитно-резонансную томографию, бактериологических (окраска мазка патологического материала по Циль — Нильсену, посевы на жидкие (Bactec MGIT 960) и твердые (Ливенштейна — Йенсена) среды, молекулярно-генетических и гистологических методов. Взятие венозной крови для исследования производилось до начала пациентом противотуберкулезной терапии или в сроки не более чем две недели от начала приема противотуберкулезных препаратов (ПТП). Изучаемые иммунологические параметры оценивались как в целом среди всей группы пациентов, так и в подгруппах, в зависимости от их демографических, социально-эпидемиологических и клинических особенностей, включая гендерные различия, первичность выявленного случая ТБ, факторы риска развития ЛУ ТБ, бактериовыделение, лекарственную чувствительность возбудителя, наличие ВИЧ-инфекции, вирусных гепатитов

В и С и других состояний. Включение пациентов осуществлялось после подписания добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Дизайн и протокол исследования одобрены Этическим комитетом Научно-исследовательского института детских инфекций.

Лабораторное иммунологическое исследование, в частности, тест цельной крови (ТЦК), выполнялся в соответствии со стандартными операционными процедурами (СОП) с панелью антигенов *MT*, ВИЧ, ЭБВ, ЦМВ и вируса гриппа. Характеристика используемых антигенов представлена в таблице 1.

Супернатант был собран и хранился при -70°C в двух аликвотах. Материал одной аликвоты был исследован на содержание ИФН в иммуноферментном анализе (ИФА) для первичной оценки теста. Гепаринизированная разведенная венозная кровь в объеме 100 мкл (фактор разведения 1:5) вносилась в лунки предварительно подготовленных планшетов, содержащих специфические антигены в концентрации 2 мкг/мл, растворенные в 100 мкл питательной среды RPMI-1640, обогащенной L-глутамином (2nM), содержащей пенициллин (100 МЕ/мл) и стрептомицин (10мг/мл). Планшеты затем инкубировались в атмосфере, содержащей 5% углекислого газа, при температуре 37°C в течение 7 дней. Фитогемагглютинин (ФГА) использовался как положительный контроль, питательная среда без антигена — как отрицательный контроль. На 7-й день супернатант собирался и тестировался на концентрацию ИФН с использованием ИФА тест-системы МАБТЕК, в соответствии с инструкцией производителя.

Полученные данные обрабатывались с использованием программных продуктов Tecan Magellan (первичная обработка), Statistica 8.0 и Graphpad PRISM 6.0 (статистический анализ).

Результаты и обсуждение

Средний возраст пациентов, включенных в исследование, составил $34 \pm 11,6$ года (табл. 2). Преобладали мужчины (65,4%), половина участников (50,0%) была потребителями инъекционных наркотиков (ПИН), более 1/3 пациентов (36,5%) находились в местах лишения свободы (МЛС), четверть исследуемых имела в анамнезе контакт с больным активным туберкулезом в течение последних двух лет (25,0%), доля бездомных составила 3,8%, мигрантов — 5,8%, имели низкую приверженность (комплаинс) к обследованию и лечению около одной трети участников (28,8%). Положительный ВИЧ-статус был установлен более чем у половины пациентов (51,9%), вирусным гепатитом С (ВГС) страдали 44,2% больных, в двух случаях был выявлен гепатит в цирротической стадии (3,8%) и по одному случаю каждый — неопластический процесс и сахарный диабет (1,9%).

Таблица 1

Использованные антигены

Антиген M.Tb	Тип антигена	Название	Биология	Производитель
Rv0447c	Белок	Вероятно, циклопропан ацил-фосфолипид синтетаза. ufaA1.	Несекретируемый протеин, ранее известный как цель для гуморального и клеточного иммунного ответа [5, 9]. Обладает метилтрансферазной активностью. Участвует в биосинтезе липидов, а также в устойчивости к оксидативному стрессу и выживанию [10]. Экспрессируется как M.tb, БЦЖ, так и атипичными микобактериями	GenScript, Piscataway, USA
Rv2957	Белок	PGL/p-HBAD гликозилтрансфераза MT3031.	Несекретируемый протеин, ранее известный как цель для гуморального и клеточного иммунного ответа [5, 9, 10]. Гликозилтрансферазная активность, переносит тексосилные группы. Участвует в синтезе гликолипидов [11]. Известен как цель для лекарств. Экспрессируется как M.tb, БЦЖ, так и атипичными микобактериями.	GenScript, Piscataway, USA
Rv2958c	Белок	PGL/p-HBAD Биосинтез гликозилтрансфераз. MT3034.	Несекретируемый протеин, ранее известный как цель для гуморального и клеточного иммунного ответа [5, 9]. Участие в процессе биосинтеза гликолипидов. Гликозилтрансферазная активность [11]. Играет роль в развитии иммунного ответа / толерантности [12]. Экспрессируется как M.tb, БЦЖ, так и атипичными микобактериями.	GenScript, Piscataway, USA
Rv3804c	Белок	Ag85A. Секретируемы антиген 85A.. fbpA. MPT59	Секретируемый антиген M.tb, основная цель Т-клеточного иммунного ответа, экспрессируется на ранних стадиях инфекционного процесса. Отвечает за высокое сродство микобактерий к фибринэктину. Играет роль в синтезе клеточной стенки. Обладает микозилтрансферазной активностью в биосинтезе димикольта тригалоэзы [13]. Экспрессируется как M.tb, БЦЖ, так и атипичными микобактериями. Используется в разрабатываемых вакцинах [14].	Aeras, Rockville, USA
Rv3875	Белок	ESAT-6. 6 KDa Ранний секретируемый антиген esxA.	Рано экспрессируемый и синтезируемый целевой антиген [15]. Роль в патогенности M.tb за счет стимуляции апоптоза макрофагов и эпителиальных клеток легких. Кроме того, иммуномодулирующий эффект в отношении макрофагов [16]. Относится к региону RD1, представленному у M.tb, но отсутствующему у BCG .	Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark
CMV	Белок	ЦМВ человека pp65 UL83	Структурный белок, экспрессируемый на поверхности клеток, инфицированных ЦМВ. Основной компонент оболочки субвирусной частицы. pp65 является иммунодоминантной целью для CD4+ и CD8+ Т-клеточного иммунного ответа против ЦМВ.	Prospec, Ness Ziona, Israel
EBV	Белок	EBV ядерный антиген 1 EBNA-1	EBNA-1 связывается ДНК и активирует ее репликацию из латентной фазы. Играет роль в ВЭБ-опосредованном нарушении антиген презентации [17].	Prospec, Ness Ziona, Israel
EBV	Белок	EBV ядерный антиген 3 EBNA-3	Три взаимосвязанных ядерных протеина, экспрессируемых во время латентной ВЭБ-инфекции, EBNA-3A, -3B, and -3C, важны для вызываемой ВЭБ иммортализации В-лимфоцитов <i>in vitro</i> . Является иммунодоминантным целевым регионом для иммунного ответа против ВЭБ <i>in vivo</i>	Bioclone Inc, San Diego, USA
HIV	Белок	HIV gag	Белок Gag ВИЧ-1 необходим для сборки вирусоподобных частиц, а также созревания вириона после выхода частицы из клетки и ранние этапы репликации вириона после проникновения в клетку.	Prospec, Ness Ziona, Israel

Окончание таблицы 1

Антиген М.Тб	Тип антигена	Название	Биология	Производитель
HIV	Смесь протеинов	Фрагменты p17-p24, gp41-gp120	Серологически иммунодоминантный регион of p17-p24, gp41-gp120	Prospec, Ness Ziona, Israel
Influenza California 2009	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H1N1/California/07/2009.	Вакцина против гриппа, штамм A/H1N1/California/07/2009	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Brisbane 2007	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит, A/H1N1/Brisbane/59/2007.	Вакцина против гриппа, штамм A/H1N1/Brisbane/59/2007.	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Uruguay 2007	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H3N2/Uruguay/716/2007.	Вакцина против гриппа, штамм A/H3N2/Uruguay/716/2007	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Florida 2006	Смесь протеинов	Inactivated split monovalent bulk, B/Florida/4/2006.	Вакцина против гриппа, штамм B/Florida/4/2006.	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza Vietnam 2004	Смесь протеинов	Инактивированный моновалентный сплит A/H5N1/Vietnam/1203/2004.	Вакцина против гриппа, штамм A/H5N1/Vietnam/1203/2004	Baxter Innovations GmbH, Wien, Austria
Influenza	Смесь 49 пептидов длиной 15 АК, перекрывающиеся на 11 АК	Белок М1	Матричный белок вируса гриппа, формирует слой внутри вирусной оболочки и осуществляет энкапсуляцию РНК-нуклеопротеинового ядра в мембранную оболочку [18].	JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany

Таблица 2

Социально-эпидемиологическая и клиническая характеристика пациентов исследуемой группы

Характеристика	Всего (N = 52)	
	N	%
Средний возраст (годы)	34±11,6	
Мужчины	34	65,4
Наркомания	26	50,0
Находились в местах лишения свободы	19	36,5
Тубконтакт	13	25,0
Бездомные	2	3,8
Мигранты	3	5,8
Низкий комплайнс	15	28,8
ВИЧ-инфекция	27	51,9
ВГС	23	44,2
Цирроз печени	2	3,8
Неоплазия	1	1,9
Сахарный диабет	1	1,9

Клинико-рентгенологическая и бактериологическая характеристика пациентов представлены в таблице 3. Согласно критериям включения, большинство участников имели впервые выявленные

случаи туберкулеза — 82,7%, рецидив заболевания установлен у 17,3% больных. Генерализованный процесс с сочетанием туберкулеза органов дыхания с внелегочными поражениями (периферические лимфатические узлы, почки, костно-суставная система, селезенка и др.) выявлен у 9 исследуемых (17,3%), которые все имели ВИЧ-положительный статус. По клинической структуре поражения органов дыхания, включая генерализованный процесс, были представлены преимущественно инфильтративными изменениями в легочной ткани (40,4%), диссеминация в легочной ткани, в том числе миллиарные очаги, встречалась у 28,8% исследуемых, изолированное вовлечение внутригрудных лимфатических узлов — у 13,5%, очаговые изменения в легких — у 9,6%, плевральный выпот — у 7,7% больных. Деструктивные изменения в легочной ткани имелись более чем у четверти участников (26,9%), следы перенесенного в прошлом туберкулеза в виде кальцинатов внутригрудных лимфатических узлов, рубцовых и фиброзных изменений в легких на фоне активного специфического процесса — у 13,5% пациентов. Бактериовыделение было обнаружено более чем у половины исследуемых (59,6%), среди которых доля пациентов с ЛУ МТ составила 45,2% (табл. 4). Изолированная резистентность МТ к одному ПТП выявлена в двух

случаях, к сочетанию двух препаратов — в одном случае, трех — в восьми, четырех — в двух и пяти ПТП — в одном случае. Наибольшая частота ЛУМТ обнаружена к стрептомицину (S), как в отдельности, так и в сочетании с другими лекарствами (85,7%), удельный вес МЛУ ТБ, определяемый как процесс с устойчивостью МТ по крайней мере к двум противотуберкулезным препаратам основной группы: рифампицину (R) и изониазиду (H), составил 71,4%. В четырех случаях ЛУМТ носила приобретенный характер (28,6%), соответственно, первичная лекарственная устойчивость МТ была установлена в остальных 10 случаях (71,4%). К наиболее значимым факторам риска развития ЛУ ТБ были отнесены известный контакт с больным ЛУ туберкулезом, пребывание в МЛС, рецидив ранее перенесенного ТБ, ВИЧ-инфекция, низкая приверженность к обследованию и лечению.

Таблица 3

**Клинико-рентгенологическая
и бактериологическая характеристика
пациентов, вовлеченных в исследование**

Характеристика	Всего (N = 52)	
	N	%
Впервые выявленный ТБ	43	82,7
Рецидив ТБ	9	17,3
Генерализованный ТБ	9	17,3
Инфильтративный ТБ	21	40,4
Диссеминированный ТБ	15	28,8
ТБ внутригрудных лимфоузлов	7	13,5
Очаговый ТБ	5	9,6
Плевральный выпот	4	7,7
Деструктивные изменения	14	26,9
Кальцинаты, рубцы, фиброз	7	13,5
Бактериовыделение	31	59,6

Таблица 4

**Лекарственная устойчивость МТ у больных
туберкулезом с бактериовыделением**

Характеристика	Всего (N = 31)	
	N	%
ЛУ ТБ	14	45,2
ЛУ ТБ	Всего N = 14	
1 ПТП	2	14,3
2 ПТП	1	7,1
3 ПТП	8	57,2
4 ПТП	2	14,3
5 ПТП	1	7,1
S	12	85,7
МЛУ ТБ	10	71,4
Первичная ЛУ	10	71,4
Приобретенная ЛУ	4	28,6

Исследуемые пациенты по общему числу лейкоцитов и процентному содержанию лимфоцитов и нейтрофилов в периферической крови, косвенно отражающие состояние напряженности иммунитета, были достаточно однородны (рис. 1).

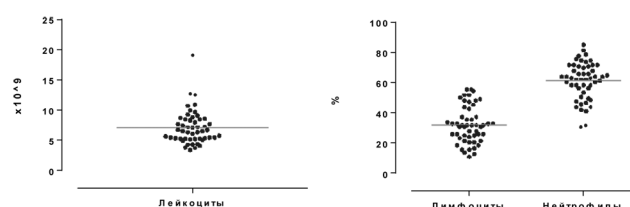


Рис. 1. Показатели клинического анализа крови у исследуемых пациентов

Результаты исследования продукции ИФН в ТЦК в ответ на стимуляцию специфическими антигенами МТ среди всех исследуемых пациентов приведены на рисунке 2. Различия в концентрациях ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции белком Rv2958c и белками Ag85a, Rv2957, Rv0447c, туберкулином (142 ± 44 vs 31 ± 12 , $p < 0,0177$; vs 49 ± 13 , $p < 0,047$; vs 26 ± 11 , $p < 0,0133$; vs $13 \pm 4,7$, $p < 0,0051$ соответственно) были статистически значимыми. Кроме того, достоверно различались концентрации ИФН после стимуляции Rv2957 и туберкулином (49 ± 13 vs $13 \pm 4,7$, $p < 0,0129$). Однако достоверной разницы между концентрациями ИФН после стимуляции ESAT-6 и туберкулином выявлено не было.

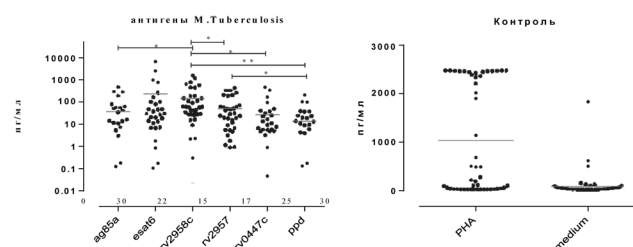


Рис. 2. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции различными белками МТ и контроль (* — $p < 0,05$ ** — $p < 0,005$)

На рисунке 3 отражены результаты исследования концентрации ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции антигенами МТ в различных подгруппах.

Достоверные различия имели место между группами пациентов без факторов риска развития ЛУ ТБ и больными группы риска (63 ± 29 vs $14 \pm 8,1$, $p = 0,0483$). Также статистически значимые различия в концентрации ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции Rv2958c наблюдались между группами пациентов без бактериовыделения и выделявшими МТ (257 ± 100 vs 61 ± 19 , $p = 0,0276$). Сле-

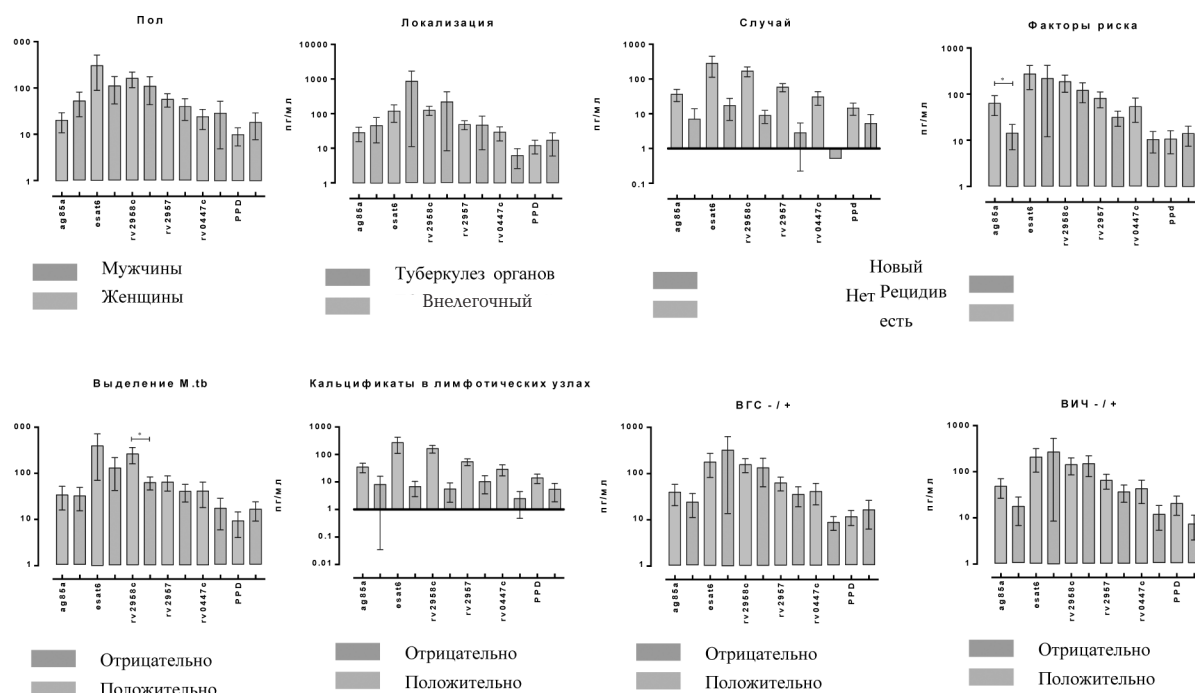


Рис. 3. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК у различных подгрупп пациентов после стимуляции белками МТ (* – $p < 0,05$)

дует отметить тенденцию к неспецифическому снижению иммунореактивности (без статистически значимых различий) у больных с рецидивом заболевания, со следами перенесенного в прошлом туберкулеза в виде кальцинатов в внутригрудных лимфатических узлах, рубцовых и фиброзных изменений в легочной ткани, по сравнению с пациентами с впервые выявленным процессом без старых специфических признаков поражения органов дыхания. Однако в подгруппах с гендерным различием (мужчины/женщины), различием локализации ТБ процесса (туберкулез органов дыхания/его сочетание с экстраторакальными поражениями), с наличием или отсутствием ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита С такой тенденции не наблюдалось.

У лиц с лекарственно-устойчивым туберкулезом по сравнению с пациентами с сохраненной лекарственной чувствительностью МТ статистически достоверных различий в концентрации ИФН в супернатанте после стимуляции белками МТ выявить не удалось (рис. 4). Тем не менее, наблюдалась тенденция к сниженной концентрации ИФН в супернатанте ТЦК в группе пациентов с ЛУ ТБ как спонтанной (отрицательный контроль), так и индуцированной различными белками МТ. При этом анализ «часть целого» концентрации ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции белками МТ показал (рис. 5), что в группе без ЛУ ТБ мак-

симальный ответ был против белка ESAT-6 (51%), а в группе с ЛУ ТБ — против белка Rv2957 (45%).

Кроме того, при стимуляции белком CMV pp65 наблюдалось статистически достоверное различие в концентрации ИФН в супернатанте в группе пациентов с лекарственной устойчивостью МТ по отношению к больным без ЛУ ТБ на фоне сохранения общей тенденции к меньшей концентрации ИФН в ТЦК супернатанте у пациентов с ЛУ ТБ.

Результаты исследования концентрации ИФН в супернатанте после стимуляции антигенами CMV, EBV, HIV и INFLUENZA дополнительно показаны на рисунке 6. Концентрация ИФН в ТЦК супернатанте была достоверно выше после стимуляции белками CMV и EBV по сравнению с белками HIV, не имея при этом статистически значимых различий между собой и с белками вируса гриппа (данные не показаны). Концентрация ИФН после стимуляции различными белками вируса гриппа также не имели достоверных различий между собой.

Для оценки ассоциации между концентрацией ИФН в ТЦК супернатанте при стимуляции белками МТ, CMV, EBV, HIV и INFLUENZA было выполнено ранжирование значений концентрации ИФН для каждого пациента: белку, стимуляция которым вызывала наибольшую концентрацию ИФН в ТЦК супернатанте у конкретного пациента присваивалось ранговое значение 1, белок, вызывавший следующую по убыванию концентрацию ИФН —

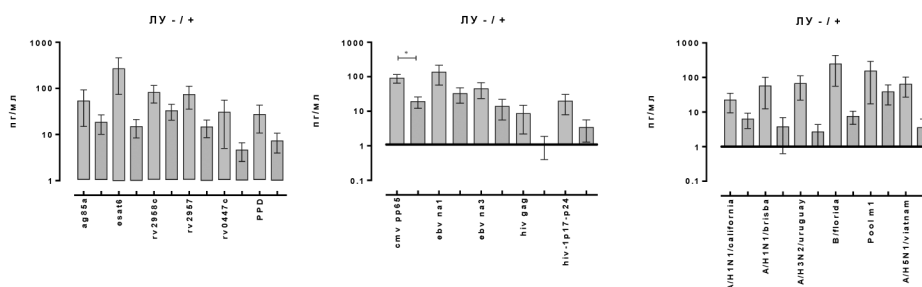


Рис. 4. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции белками МТ и различными вирусными антигенами в зависимости от лекарственной устойчивости МТ



Рис. 5. Профиль иммунореактивности пациентов к антигенам МТ в зависимости от лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза

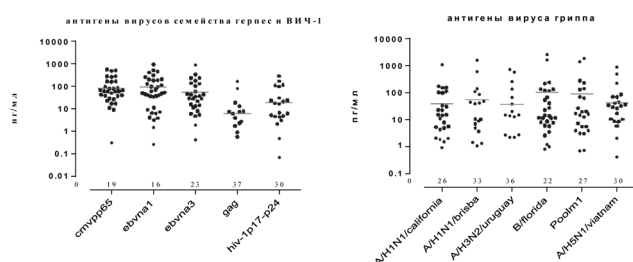


Рис. 6. Концентрация ИФН в супернатанте ТЦК после стимуляции различными вирусными антигенами

значение 2 и т.д. Затем была выполнена кросс-табуляция ранговых значений между белками МТ против CMV, EBV, HIV и INFLUENZA. Согласно данным кросс-табуляции, на первом месте по максимальной концентрации ИФН, установленной у пяти пациентов, находился белок МТ Rv2958c (рис. 7). На втором месте по рангу располагался белок pp65 CMV с максимальной концентрацией, установленной у четырех больных, у которых белок Rv2958c по уровню значения концентрации следовал за антигеном pp65 CMV. Еще у девяти участников ранги концентрации ИФН белков pp65 и Rv2958c имели значение, меньшее или равное пяти. Для других исследуемых белков подобных закономерностей выявлено не было (данные не приводятся). Кроме того, анализ данных кросс-табуляции показал наличие ассоциации между иммунным ответом на белок Rv2958 МТ и pp65CMV у одного пациента с максимальной концентрацией ИФН в супернатанте, одинаковой для CMV и МТ.

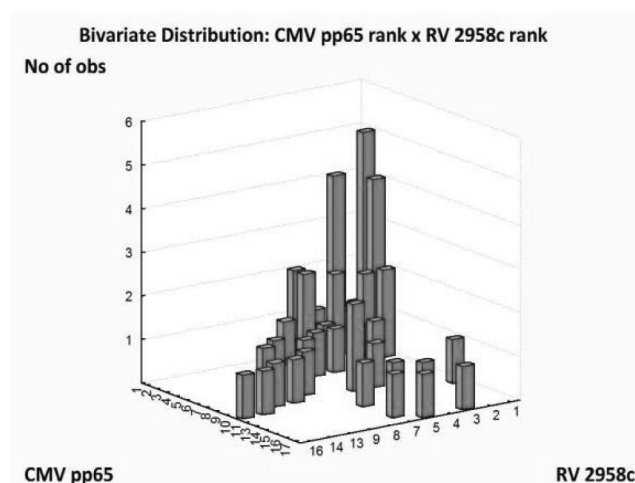


Рис. 7. Ранговый анализ иммунного ответа у пациентов исследуемой группы (CMV pp65 и RV 2958c)

Наше исследование позволило дать оценку иммуногенности ранее изученных белков МТ (Ag85a и ESAT-6), один из которых используется в коммерческом диагностическом тесте Q-GIT, в сравнении с недавно идентифицированными иммуногенными белками МТ (Rv2957, Rv2958c и Rv0447) и в сравнении с туберкулином, широко применяемым для постановки кожных проб. Следует отметить, что белок ESAT-6 не показал большей иммуногенности в сравнении с туберкулином при довольно высоком разбросе значений концентрации ИФН в супернатанте ТЦК, что, возможно, говорит о значимых различиях в Т-клеточном иммунном ответе у пациентов с активным туберкулезом. В противовес этому концентрация ИФН в ТЦК супернатанте после стимуляции Rv2958c была статистически достоверно выше по отношению к туберкулину и белкам Ag85a, Rv0447c, что может свидетельствовать о возможно большей специфичности ответа на данный антиген у пациентов с активным туберкулезом. Однако наличие бактериовыделения, чаще связанное с более активным течением инфекционного процесса и с более сильной антиген-стимуляцией, было ассоциировано с достоверно

сниженным Т-клеточным иммунным ответом на данный белок (Rv2958с).

Также необходимо отметить наблюдавшуюся тенденцию к сниженной иммунореактивности пациентов с рецидивом туберкулезного процесса и ЛУ туберкулезом, что ранее описывалось и другими авторами [8]. Важно наблюдение достоверно сниженной иммунореактивности по отношению к белку Ag85а (одному из основных компонентов клеточной мембраны МТ) у пациентов группы риска ЛУ ТБ, при отсутствии достоверных различий в иммунореактивности к белкам, участвующим во внутриклеточном обмене веществ МТ.

Интересными представляются выявленные различия в профиле иммунореактивности пациентов по отношению к различным антигенам в зависимости от лекарственной чувствительности МТ: более низкая иммунореактивность в отношении ESAT-6 и более высокая — в отношении Rv2957 у пациентов с ЛУ ТБ по сравнению с больными с сохраненной чувствительностью МТ. Необходимо указать на стабильные значения иммунного ответа в отношении Rv2958с вне зависимости от наличия или отсутствия ЛУ МТ. Также интересен факт наблюдения достоверно сниженной иммунореактивности у пациентов с ЛУ ТБ в отношении антигена рр65 CMV, что, возможно, отражает общее угнетение иммунного ответа, ассоциированного с ЛУ ТБ, но, с другой стороны, может свидетельствовать о роли цитомегаловирусной инфекции в развитии феномена ЛУ МТ. В пользу последнего говорит выявленная ассоциация иммунного ответа на данный белок и Rv2958с МТ. Однако данное предположение требует дальнейшего скрупулезного изучения

Выводы

1. Антиген MTRv2958 является наиболее сильным иммуногеном вне зависимости от лекарственной чувствительности МТ. Белок Rv2957, и в меньшей степени Ag85а, также вызывают достаточно сильный специфический иммунный ответ и имеют ассоциацию с ЛУ ТБ. Перечисленные антигены представляют интерес для дальнейшего изучения с целью разработки как новых диагностических тест систем, так и иммунноориентированной терапии. При этом белок ESAT-6 продемонстрировал весьма высокий разброс значений концентрации ИФН при отсутствии значимых различий в сравнении с туберкулином.

2. Феномен ЛУ ТБ ассоциирован со сниженной специфической и неспецифической иммунореактивностью.

3. Возможная роль вирусной ко-инфекции, в особенности CMV, в формировании специфического иммунного ответа на МТ требует дальнейшего скрупулезного изучения.

Конфликт интересов

Авторы не имеют финансового и этического конфликта интересов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении исследования администрации и сотрудникам ГКУЗ ЛО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе» и сотрудникам ФГБУ «СПб НИИФ».

Данное исследование финансировалось грантом Шведского Агентства по Международному Развитию (SIDA).

Литература

1. WHO Global tuberculosis report 2012. // http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html
2. Cagatay, T. TNF-alpha antagonist therapy modify the tuberculin skin test response. / T. Cagatay [et al.] // Rheumatol Int. — 2011. — V. 31, № 9. — P. 1147—1151.
3. Dewan, P.K. Low sensitivity of a whole-blood interferon-gamma release assay for detection of active tuberculosis. / P.K. Dewan, J. Grinsdale, L.M. Kawamura. // Clin. Infect. Dis. — 2007. — V. 44, № 1. — P. 69—73.
4. Hammond, A.S. Mycobacterium tuberculosis genome-wide screen exposes multiple CD8 T cell epitopes. / A.S. Hammond [et al.] // Clin. Exp. Immunol. — 2005. — V. 140, № 1. — P. 109—116.
5. Ahmed, R.K. Pattern recognition and cellular immune responses to novel Mycobacterium tuberculosis-antigens in individuals from Belarus / R.K. Ahmed [et al.] // BMC Infect Dis. — 2012. — V. 12. — P. 41.
6. De Groote, D. Direct stimulation of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation / D. De Groote [et al.] // Cytokine. — 1992. — V. 4, № 3. — P. 239—248.
7. Kirchner, H. A whole-blood technique for testing production of human interferon by leukocytes / H. Kirchner, C. Kleinicke, W. Digel // J. Immunol. Methods. — 1982. — V. 48, № 2. — P. 213—219.
8. Kiran, B. Can immune parameters be used as predictors to distinguish between pulmonary multidrug-resistant and drug-sensitive tuberculosis? / B. Kiran [et al.] // Arch. Med. Sci. — 2010. — V. 6, № 1. — P. 77—82.
9. Gaseitsiwe, S. Pattern recognition in pulmonary tuberculosis defined by high content peptide microarray chip analysis representing 61 proteins from M. tuberculosis / S. Gaseitsiwe [et al.] // PLoS One. — 2008. — V. 3, № 12. — P. e3840.
10. Yuan, Y. The biosynthesis of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. Enzymatic methyl(ene) transfer to acyl carrier protein bound meromycolic acid in vitro. / Y. Yuan [et al.] // J. Biol. Chem. — 1998. — V. 273, № 33. — P. 21282—21290.
11. Perez, E. Characterization of three glycosyltransferases involved in the biosynthesis of the phenolic glycolipid antigens from the Mycobacterium tuberculosis complex / E. Perez [et al.] // J. Biol. Chem. — 2004. — V. 279, № 41. — P. 42574—42583.
12. Neill, M.A. The effect of phenolic glycolipid-1 from Mycobacterium leprae on the antimicrobial activity of human macrophages. / M.A. Neill, S.J. Klebanoff // J. Exp. Med. — 1988. — V. 167, № 1. — P. 30—42.

13. Belisle, J.T. Role of the major antigen of Mycobacterium tuberculosis in cell wall biogenesis / J.T. Belisle [et al.] // Science. — 1997. — V. 276, № 5317. — P. 1420–1422.

14. Hoft, D.F. A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity / D.F. Hoft [et al.] // Vaccine. — 2012. — V. 30, № 12. — P. 2098–2108.

15. Sorensen, A.L. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis / A.L. Sorensen [et al.] // Infect Immun. — 1995. — V. 63, № 5. — P. 1710–1717.

16. Derrick, S.C. The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. / S.C. Derrick, S.L. Morris // Cell Microbiol. — 2007. — V. 9, № 6. — P. 1547–1555.

17. Levitskaya, J. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 / J. Levitskaya [et al.] // Nature. — 1995. — V. 375, № 6533. — P. 685–688.

18. Sha, B. Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1 / B. Sha, M. Luo. // Nat. Struct. Biol. — 1997. — V. 4, № 3. — P. 239–244.

Авторский коллектив:

Загдын Зинаида Моисеевна — старший научный сотрудник научно-методического отдела Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, к.м.н.; тел. +7-921-767-69-47, e-mail: dinmet@mail.ru;

Луцкий Антон Александрович — научный сотрудник отдела вирусных гепатитов и заболеваний печени Научно-исследовательского института детских инфекций, к.м.н; тел.: 8(812)234-34-16, e-mail: anton.lutckii@hotmail.com

Жирков Антон Анатольевич — младший научный сотрудник отдела клинической лабораторной диагностики Научно-исследовательского института детских инфекций; тел.: 8(812)234-34-18, e-mail: ant-zhirkov@yandex.ru;

Макаренко Ольга Александровна — врач-лаборант лаборатории иммунологических и аллергологических исследований Научно-исследовательского института детских инфекций; тел.: 8(812)234-34-18, e-mail: makarenko_oa@mail.ru

Феррара Джованни — старший консультант, научный сотрудник отделения пульмонологии Каролинского университетского госпиталя, доцент отдела пульмонологии факультета внутренних болезней университета Перуджии, PhD, MD; тел.: +4685177526, e-mail: giovanni.ferrara@ki.se;

Аксельссон-Робертсон Ребекка — руководитель отдела молекулярной, онко- и цитобиологии Каролинского университета, PhD, Post Doc; тел. +46858582217, e-mail: rebecca.axelsson@ki.se;

Мегелес Изабель — научный сотрудник Центра трансплантации аллогенных стволовых клеток (CAST) Каролинского университетского Госпиталя, PhD; тел.: +46858582217, e-mail: isabelle.magalhaes@ki.se;

Скрынник Наталья Алексеевна — главный врач Противотуберкулезного диспансера № 12, к.м.н.; тел.: +7-911-227-52-81, e-mail: skrinik@rambler.ru;

Шабалин Виктор Николаевич — заместитель главного врача по лечебной работе Зеленохолмской противотуберкулезной больницы; тел.: +7-911-989-15-38;

Джумаева Халима Назаровна — заведующая отделением для больных ВИЧ/ТБ Зеленохолмской противотуберкулезной больницы; тел.: +7-905-266-08-22;

Мейрер Маркус Джозеф — руководитель отдела терепевтической иммунологии (TIM) факультета лабораторной медицины (LABMED) и отел молекулярной, онко- и цитобиологии Каролинского университета, Центр трансплантации аллогенных стволовых клеток (CAST) Каролинского университетского госпиталя, MD, PhD, FRCP (Лондон), профессор; тел.: +46858581623, e-mail: markus.maeurer@ki.se

Сидоренко Сергей Владимирович — руководитель отдела молекулярной микробиологии и эпидемиологии Научно-исследовательского института детских инфекций, д.м.н.; профессор; тел.: 8(812)234-07-40, e-mail: sidorserg@gmail.com;

Лобзин Юрий Владимирович — директор Научно-исследовательского института детских инфекций, д.м.н., профессор, академик РАМН; тел. 8(812)234-60-04, e-mail: niidi@niidi.ru