

УДК 616.24-002.5-036.17-053

**ПРОДУКЦИЯ ГРАНУЛИЗИНА, ПЕРФОРИНА, КАТЕЛИЦИДИНА, ВИТАМИН Д СВЯЗЫВАЮЩЕГО ПРОТЕИНА, ФАКТОРА ИНГИБИЦИИ МИГРАЦИИ МАКРОФАГОВ И ИНТЕРФЕРОНА- $\gamma$  ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ ТУБЕРКУЛЕЗА ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ ДЕТЕЙ И ПОДРОСТКОВ**

**Авербах М.М. (мл.), Панова Л.В., Губкина М.Ф.**

*ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза», Москва, e-mail: amm50@mail.ru*

Исследовали динамику содержания в плазме цитолитических молекул (гранулизин, перфорин, кателицидин), витамин Д связывающего протеина (ВДБ), спонтанную продукцию интерферона- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ) и фактора торможения миграции макрофагов (МИФ) методом иммуноферментного анализа. Анализ проведен у 85 больных с деструктивными формами ( $n = 30$ ) и ТВГЛУ/очаговыми формами туберкулеза ( $n = 55$ ). Группу инфицированных МБТ составили 9 пациентов, имевших контакт с больными туберкулезом и положительные кожные пробы. Содержание в плазме цитолитических молекул и ВДБ у больных исследуемых групп в сравнении с группой инфицированных МБТ показало отсутствие различий для гранулизины, кателицидина и ВДБ. Уровень перфорина был достоверно низким только в группе деструктивного туберкулеза по сравнению с группой инфицированных МБТ ( $33,8 \pm 2,5$  нг/мл и  $39,5 \pm 1,1$  нг/мл, соответственно,  $P = 0,04403$ ). Химиотерапия практически не оказывала влияние на содержание кателицидина, ВДБ. Уровень гранулизины увеличивался к 6 мес. только у больных очаговым туберкулезом ( $5,6 \pm 0,2$  нг/мл и  $6,47 \pm 0,3$  нг/мл,  $P = 0,02939$ ). Уровень перфорина при деструктивном туберкулезе был достоверно низким по сравнению с больными ТВГЛУ и очаговым туберкулезом как на сроке 3 мес. ( $31,7 \pm 1,6$  нг/мл,  $38,8 \pm 1,6$  нг/мл;  $P = 0,00635$  и  $42,1 \pm 1,3$  нг/мл;  $P = 0,00012$  соответственно), так и на сроке 6 мес. ( $28,9 \pm 2,3$  нг/мл по сравнению с  $39,1 \pm 3,1$  нг/мл;  $P = 0,017774$  и  $38,3 \pm 0,8$  нг/мл;  $P = 0,00138$  соответственно). Продукция ИНФ- $\gamma$  в культуре клеток увеличивалась у всех групп больных к 3 мес. химиотерапии и у больных с деструктивным туберкулезом была достоверно выше, чем у больных с ТВГЛУ и очаговым туберкулезом ( $58,8 \pm 8,7$  пг/мл,  $13,1 \pm 2,5$  пг/мл и  $4,7 \pm 3,4$  пг/мл;  $P = 0,01741$ ). Продукция МИФ в группе больных ТВГЛУ до начала лечения была достоверно ниже, чем у больных очаговым и деструктивным туберкулезом ( $837,3 \pm 107,6$  пг/мл,  $2455,1 \pm 522,9$  пг/мл и  $1439,0 \pm 188,8$  пг/мл;  $P = 0,00965$  и  $P = 0,01826$  соответственно). Курс химиотерапии не влиял на уровень МИФ у больных ТВГЛУ и деструктивным туберкулезом и снижался к 6 мес. при очаговом туберкулезе (3 мес. –  $2246,6 \pm 366,8$  пг/мл и 6 мес. –  $952,2 \pm 36,2$  пг/мл;  $P = 0,00486$ ). Полученные результаты указывают на значимость уровня продукции перфорина и МИФ для локализации туберкулезного процесса в ткани легких при очаговых формах по сравнению с деструктивными процессами. Уровень продукции цитолитических молекул не имеет решающего значения для развития ТВГЛУ.

**Ключевые слова:** туберкулез, дети, подростки, цитолитические молекулы, МИФ, ИНФ- $\gamma$

**DYNAMIC CHANGES OF GRANULISINE, PERFORIN, CATHELICYDINE, VITAMIN D BINDING PROTEIN, MACROPHAGE MIGRATION INHIBITON FACTOR AND INTERFERON- $\gamma$  IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH DIFFERENT FORMS OF TUBERCULOSIS**

**Averbakh M.M. (jr.), Panova L.V., Gubkina M.F.**

*Central Research Institute for Tuberculosis, Moscow, e-mail: amm50@mail.ru*

The dynamics of the plasma content of cytolytic molecules (granuluzin, perforin, catelicidin), vitamin D of the binding protein (VDB), spontaneous production of interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) and the inhibition of migration of macrophages (MIF) was evaluated by the enzyme immunoassay methods. The analysis was carried out in 85 patients with destructive forms ( $n = 30$ ) and TBLN / focal forms of tuberculosis ( $n = 55$ ). The MTB infected group was consisted of 9 patients who had contact with patients with tuberculosis and positive skin tests. No difference was found for granulysin, cathelicidin and VDB plasma content in the patients groups compared with the MTB infected group. The level of perforin was low only in the group of destructive tuberculosis in comparison with the group of infected MBT ( $33.8 \pm 2.5$  ng / ml and  $39.5 \pm 1.1$  ng / ml, respectively,  $P = 0.04403$ ). Chemotherapy had no effect on the cathelicidin, VDB plasma content. The granulysin level was increased in 6 mo in patients with focal tuberculosis ( $5.6 \pm 0.2$  ng / ml and  $6.47 \pm 0.3$  ng / ml,  $P = 0.02939$ ). The perforin level was low in destructive tuberculosis comparison to TBLN/focal patients both at 3 mo. ( $31.7 \pm 1.6$  ng / ml,  $38.8 \pm 1.6$  ng / ml,  $P = 0.00635$  and  $42.1 \pm 1.3$  ng / ml,  $P = 0.00012$ , respectively) and 6 mo ( $28.9 \pm 2.3$  ng / ml compared with  $39.1 \pm 3.1$  ng / ml,  $P = 0.017774$  and  $38.3 \pm 0.8$  ng / ml,  $P = 0.00138$ , respectively). The cell culture INF- $\gamma$  production was increased at 3 mo in all patients groups and in patients with destructive tuberculosis was significantly higher than in patients with TBLN/focal tuberculosis ( $58.8 \pm 8.7$  pg / ml,  $13.1 \pm 2.5$  pg / ml and  $4.7 \pm 3.4$  pg / ml,  $P = 0.01741$ ). The MIF production in TBLN group was significantly lower before treatment compare to patients with focal and destructive tuberculosis ( $837.3 \pm 107.6$  pg / ml,  $2455.1 \pm 522.9$  pg / ml and  $1439.0 \pm 188.8$  pg / ml,  $P = 0.00965$  and  $P = 0.01826$ , respectively). The course of chemotherapy had no affect on MIF level in TBLN and destructive tuberculosis patients and decreased by 6 mo in focal tuberculosis group (3 months –  $2246.6 \pm 366.8$  pg / ml and 6 months –  $952.2 \pm 36.2$  pg / ml,  $P = 0.00486$ ). The obtained results indicate to the significance of perforin and MIF production for the localization of the tuberculosis lung process in focal forms in comparison with destructive processes. The level of cytolytic molecules production is not decisive for the development of TBLN.

**Keywords:** tuberculosis, children, adolescents, cytolytic molecula, interferon- $\gamma$ , macrophage migration inhibiton factor

Структура заболеваемости туберкулезом детей и подростков отличается от взрослого контингента больных и в ней достаточно высока доля «малых» форм туберкулеза (ТВГЛУ – туберкулез внутригрудных лимфатических узлов, и очаговый туберкулез легких), в то же время среди легочных форм туберкулеза встречаются и деструктивные процессы [1]. В клинической практике ТВГЛУ наблюдаются значительно чаще, чем первичный туберкулезный комплекс, хотя лимфаденит является неотъемлемой его частью. Согласно классификации ВОЗ ТВГЛУ относят к формам внелегочного туберкулеза и редко выделяют в исследованиях в отдельную группу, поэтому сопоставить частоту встречаемости ТВГЛУ у больных детей и подростков в различных странах крайне сложно [2].

По существующим к настоящему моменту представлениям макрофаги и миелоидная субпопуляция дендритных клеток верхних и нижних отделов респираторного тракта первыми контактируют с вдыхаемыми чужеродными антигенами (в том числе и микобактериями), фагоцитируют их через посредство целого ряда рецепторов (маннозный рецептор, сурфактант D, DC-SIGN-специфичная для дендритных клеток интегринавая молекула, С-лектиновый рецептор, Nod-подобные молекулы и Toll-подобные молекулы). Впоследствии фагоцитированные антигены переносятся в регионарные лимфоузлы, что показано с помощью метки микобактерий флюоресцирующим белком GFP. Здесь дендритные клетки вырабатывают достаточное количество IL-12p40, IL-12Rβ1 и CD11c и обеспечивают инициализацию иммунного ответа через премирование Т хелперов 1 с последующей выработкой клеток эффекторов и памяти, при этом субпопуляция клеток памяти имеет способность селективно мигрировать в места первичного попадания антигена. Однако микобактерии, попавшие в лимфоузлы в дендритных клетках, обладают способностью снижать презентующую способность поверхностных молекул MHC class II и создают тем самым условия для длительной персистенции в дендритных клетках лимфоузлов [3].

Исследования, подтверждающие наличие микобактерий в лимфоузлах, немногочисленны и касались преимущественно их периферических локализаций, для ТВГЛУ вообще единичные. Если гистологически различные признаки туберкулезного воспаления выявлялись во всех исследованных биоптатах, то методом посева на ВАСТЕС микобактерии выявлены в 40–60%, методом окрашивания по Циль-Нильсену в 13,3%.

Молекулярно-генетические методы позволяют увеличить выявляемость МБТ до 82,5%, при этом дальнейшая характеристика изолятов *M. tuberculosis* выявила принадлежность к 26 различным сполиготипам (SIT) и 13 к вновь выявленным образцам. Наиболее распространенными штаммами были SIT149, SIT53, SIT26 и SIT37 сублиний T3-ETH, T1, CASI-DELHI и T3 [4]. При сравнении иммуногистохимическими методами обнаружения антигенов микобактерий (секретируемые – MPT32, MPT44, MPT46, MPT51, MPT53, MPT59, MPT63, MPT64 и соматические – Mce1A, Hsp65 и MPT57) в биоптатах легких и лимфоузлов было показано, что в ткани легких обнаруживались как секреторные, так и соматические антигены, а в лимфоузлах прежде всего соматические антигены. Из секреторных антигенов в обоих случаях постоянно обнаруживался только MPT64, что указывало на преимущественное накопление этого антигена в клетках гранулемы в условиях хронически текущей инфекции. Компоненты комплекса антигена 85 (MPT44 (Ag85A), MPT51 (Ag85D), MPT59 (Ag85B)) выявлялись в половине случаев. Эти данные указывают на снижение секреторной активности МБТ, находящихся в лимфоузлах и пребывании их преимущественно в персистирующем состоянии [2]. Этому процессу со стороны макроорганизма способствовали различные факторы: повышенная экспрессия генов IL-10 и TGF-β эпителиоидными и многоядерными клетками и факторов апоптоза (Bcl2, Bax, FasL и Fas) гигантскими многоядерными клетками, которые могут использоваться микобактериями для уклонения от иммунного ответа и персистенции в тканях хозяина [5].

По существующим на сегодня представлениям различные субпопуляции Т и В клеток и гуморальные факторы адаптивного звена иммунитета являются ведущими в адекватном функционировании противотуберкулезного иммунитета, а реакции врожденного иммунитета преимущественно активны на стадии «латентной» фазы туберкулеза, определяющегося наличием положительных кожных проб и IGRAs-тестов с антигенами микобактерий [6]. Поскольку данные положения получены в результате сравнительного исследования латентных форм и активно распространенного туберкулезного процессов, и небольшие локальные формы практически не находились в поле зрения исследователей, то степень «активности» двух основных звеньев нуждается в дальнейшем изучении.

Эффекторная часть врожденного иммунитета представлена цитолитическими

молекулами (гранулизин, кателицидин, перфорин, гранзимы А и В и  $\beta$ -дефензином, содержатся в секреторных ацидофильных гранулах цитотоксических Т-лимфоцитов, небольшой популяцией МНС – не рестриктированных  $\gamma\delta$  Т ( $CD3^+\gamma\delta$  TCR<sup>+</sup>) клеток, и НК-клетках и способны лизировать опухолевые клетки и внутриклеточно располагающиеся вирусы и микроорганизмы, такие как *Mycobacteria*, *Brucella* [7].

Адаптивные реакции противотуберкулезного иммунитета крайне разнообразны по субпопуляциям Т и В клеток, спектру цитокинов и хемокинов, и клеток и факторов фагоцитарного звена. Среди цитокиновых факторов, выделяемых Т клетками, ведущая роль отведена интерферону- $\gamma$  (ИНФ- $\gamma$ ), который вырабатывается в основном премированными CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> Т клетками и в меньшей степени лимфоцитами, относящимися к звену врожденного иммунитета  $\gamma\delta$  Т клетками, НК Т клетками и НК клетками. Наиболее высокий уровень экспрессии гена ИНФ- $\gamma$  и его выработка осуществляется лимфоцитами Т хелперами 1 типа, которые активируют киллинг макрофагами микробных тел, усиливают цитотоксическую активность других клеток, индуцируют апоптоз эпителиальных клеток кожи и слизистых, регулируют экспрессию белков МНС I и II класса и презентацию антигенов. Существует значительная вариабельность выработки ИНФ- $\gamma$  у больных туберкулезом, и если до начала лечения она в целом низкая, то к 6 месяцам проведения противотуберкулезной химиотерапии она возрастает, но отличается значительной вариабельностью показателей в зависимости от степени выраженности и характера течения процесса [8].

Фактор торможения миграции макрофагов (МИФ) является одним из первых открытых цитокинов, основная функция которого состоит в угнетении хаотичной миграции макрофагов и накоплении в очагах воспаления и последующей функциональной их поляризацией на М1 и М2 субпопуляции. В многочисленных исследованиях показано увеличение продукции МИФ в супернатантах клеточных культур и в сыворотке больных туберкулезом, а также его наличие в тканевых структурах гранулем экспериментальных животных и биоптатах лимфоузлов больных туберкулезом, где он способствует накоплению клеток через усиление экспрессии ряда хемокинов (моноцитарный хемоаттрактантный протеин MCP-1 и молекул адгезии I-CAM-1 и V-CAM-1) [9]. Ранее нами описана динамика продукции МИФ в культуре крови в зависимости от положительного, торпидного или прогресси-

рующего характера течения туберкулезного процесса у подростков, больных деструктивными формами туберкулеза [10]. Однако динамика выработки МИФ у больных «малыми» формами туберкулеза органов дыхания пока не изучена.

Целью настоящего исследования явилось изучение значимости динамических изменений цитолитических молекул врожденного иммунитета (гранулизина, перфорина, кателицидина и витамин Д связывающего протеина), фактора ингибиции миграции макрофагов и ключевого цитокина приобретенного противотуберкулезного иммунитета ИНФ- $\gamma$  у детей и подростков, больных различными формами туберкулеза органов дыхания.

### Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 85 больных, разделенных на три группы. В группу больных с деструктивным туберкулезом включено 30 человек в возрасте от 12 до 17 лет. Инфильтративный туберкулез в фазе распада и обсеменения диагностирован у 25 человек, диссеминированный туберкулез в фазе распада – у 1 человека, множественные туберкулемы в фазе распада и обсеменения – у 2-х человек, фиброзно-кавернозный туберкулез – у 1 человека и казеозная пневмония – 1 человек.

В исследование включено 55 больных в возрасте от 3 до 16 лет с «малыми» формами туберкулеза органов дыхания. Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (ТВЛУ) в фазе уплотнения и начинающейся кальцинации диагностирован у 25 человек, в том числе с очагами отсева в легочную ткань – 15 человек; очаговый туберкулез легких – 30 человек, из которых процесс находился в фазе инфильтрации – 12 чел., в фазе уплотнения и начинающейся кальцинации – 18 чел.

Группу инфицированных МБТ составили 9 пациентов в возрасте от 5 до 14 лет, обследованных по поводу контакта с больными туберкулезом и имевших положительные реакции пробы Манту с 2 ТЕ и Диаскинтест.

Гранулизин, кателицидин, перфорин-1 и витамин Д связывающий протеин определяли в К<sub>3</sub>ЭДТА плазме методом иммуноферментного анализа с помощью наборов SEB517Hu, CEC419Hu, SEB317Hu и SEB810Hu (Cloud-Clone Corp.) согласно инструкции изготовителя. Спонтанную продукцию МИФ определяли в супернатантах суточных культур цельной крови. Образцы супернатантов собирали через 18–22 часа культивирования. МИФ определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора DuoSet Human MIF иммуноферментного анализа R@D (Великобритания). Спонтанную продукцию ИНФ- $\gamma$  определяли в супернатантах культур мононуклеаров больных туберкулезом, полученных из гепаринизированной крови. После лизиса эритроцитов и 3-кратного отмывания мононуклеары культивировали в количестве  $1 \times 10^6$  кл/мл культуральной среды RPMI 1640 с необходимыми добавками. Образцы супернатантов собирали через 22–24 часа культивирования. Концентрацию цитокина определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора «Вектор-Бест» (Россия). Результаты обрабатывались статистически с помощью пакета Microsoft Excel.

### Результаты исследования и их обсуждение

Изучение содержания в плазме крови уровня цитолитических молекул и ВДБ у больных исследуемых групп в сравнении с группой инфицированных МБТ показало отсутствие различий для гранулизина, кателицидина и ВДБ. Содержание перфорина было достоверно низким в группе деструктивного туберкулеза по сравнению с группой инфицированных МБТ ( $33,8 \pm 2,5$  нг/мл и  $39,5 \pm 1,1$  нг/мл, соответственно,  $P = 0,04403$ ), тогда как для группы очагового туберкулеза и ТВГЛУ различия были статистически недостоверными (табл. 1).

Проведение курса химиотерапии практически не оказывало влияния на содержание гранулиза в плазме крови в исследуемых группах больных за исключением достоверного возрастания его содержания к 6 мес. у больных очаговым туберкулезом ( $5,6 \pm 0,2$  нг/мл и  $6,47 \pm 0,3$  нг/мл,  $P = 0,02939$ ) (табл. 1, рис. 1, А). Содержание перфорина плазмы в группах больных также не изменялось под влиянием курса химиотерапии, но при деструктивном туберкулезе его уровень был достоверно низким по сравнению с больными ТВГЛУ и очаговым туберкулезом как на сроке 3 мес. ( $31,7 \pm 1,6$  нг/мл по сравнению с  $38,8 \pm 1,6$  нг/мл;  $P = 0,00635$  и  $42,1 \pm 1,3$  нг/мл;  $P = 0,00012$  соответственно), так и на сроке 6 мес. ( $28,9 \pm 2,3$  нг/мл по сравнению с  $39,1 \pm 3,1$  нг/мл;  $P = 0,017774$  и  $38,3 \pm 0,8$  нг/мл;  $P = 0,00138$  соответственно) (табл. 2, рис. 1, Б). В исследованных группах также не наблюдалось значимых изменений плазменного содержания кателицидина и ВДБ (табл. 2, рис. 2, А и Б).

В оценке эффективности основного цитокина адаптивного противотуберкулезного иммунитета ИНФ- $\gamma$  мы ориентировались на спонтанную продукцию в суточной культуре крови, которая отражает тенденции его динамики у больных туберкулезом детей и подростков [11]. В целом индивидуальные показатели спонтанной продукции этого ци-

токина у больных характеризуются значительной вариабельностью. Так у больных очаговым туберкулезом до начала лечения она отсутствует и к 3 мес. возрастает до  $4,7 \pm 3,4$  пг/мл и впоследствии достоверно не меняется (6 мес.  $15,5 \pm 7,6$  пг/мл). У больных ТВГЛУ до начала лечения она составила  $4,4 \pm 2,4$  пг/мл и к 3 мес. возросла до  $13,1 \pm 2,5$  пг/мл ( $P = 0,03471$ ) и впоследствии достоверно не менялась (6 мес.  $10,0 \pm 5,3$  пг/мл). У больных деструктивными процессами до начала лечения спонтанная продукция была ниже границы чувствительности метода в 40–60% случаев. К 3 мес. отмечен подъем продукции ИНФ- $\gamma$ , который прослеживался до 6 месяцев химиотерапии (0 мес.  $4,6 \pm 2,4$  пг/мл,  $58,8 \pm 8,7$  пг/мл,  $P = 0,00824$  и 6 мес.  $23,9 \pm 7,6$  пг/мл,  $P = 0,00915$ ), но при этом сохранялись выраженные индивидуальные различия выработки фактора. Следует отметить, что спонтанная продукция ИНФ- $\gamma$  у больных с деструктивным туберкулезом через 3 мес. лечения была достоверно выше, чем у больных с ТВГЛУ и очаговым туберкулезом ( $58,8 \pm 8,7$  пг/мл,  $13,1 \pm 2,5$  пг/мл и  $4,7 \pm 3,4$  пг/мл;  $P = 0,01741$ ) (табл. 3, рис. 3, А).

Спонтанная продукция МИФ в группе больных ТВГЛУ до начала лечения находилась на уровне  $837,3 \pm 107,6$  пг/мл и была достоверно ниже, чем у больных очаговым туберкулезом  $2455,1 \pm 522,9$  пг/мл ( $P = 0,00965$ ) и деструктивным туберкулезом  $1439,0 \pm 188,8$  пг/мл ( $P = 0,01826$ ). В процессе проведения химиотерапии (через 3 и 6 мес. лечения) уровень продукции МИФ достоверно не менялся как в группе больных ТВГЛУ ( $1462,9 \pm 384,7$  пг/мл и  $1451,1 \pm 252,9$  пг/мл соответственно), так и у больных с деструктивными процессами (3 мес. –  $2122,7 \pm 362,4$  пг/мл и 6 мес. –  $2572,2 \pm 661,7$  пг/мл). В группе больных очаговым туберкулезом уровень продукции МИФ достоверно снижается к 6 мес. лечения (3 мес. –  $2246,6 \pm 366,8$  пг/мл и 6 мес. –  $952,2 \pm 36,2$  пг/мл;  $P = 0,00486$ ) (табл. 3, рис. 3, Б).

**Таблица 1**

Содержание цитолитических молекул сыворотки у инфицированных МБТ и больных деструктивными и «малыми» формами туберкулеза органов дыхания до начала противотуберкулезной терапии

Факторы	Гранулизин (нг/мл)	Перфорин (нг/мл)	Кателицидин (мкг/мл)	ВДБ (мкг/мл)
Формы ТБ				
Очаговый ТБ	$5,6 \pm 0,2$	$38,4 \pm 0,9$	$1,45 \pm 0,15$	$1,5 \pm 0,08$
ТВГЛУ	$4,5 \pm 0,6$	$39,15 \pm 1,2$	$1,7 \pm 0,13$	$1,77 \pm 0,1$
Деструктивный ТБ	$5,6 \pm 0,8$	$33,8 \pm 2,5^*$	$1,55 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
Инфицированные МБТ	$4,6 \pm 0,6$	$39,5 \pm 1,1$	$1,7 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,04$

Примечание. \*  $P = 0,01366$  по сравнению с группой инфицированных.

**Таблица 2**

Динамические изменения уровня цитолитических молекул и витамин Д связывающего протеина у больных с различными клиническими формами туберкулеза в процессе проведения химиотерапии

Показатель / Группы больных	Сроки обследования		
	до начала химиотерапии	через 3 мес. химиотерапии	через 6 мес. химиотерапии
Гранулизин (нг/мл)			
Очаговый ТБ	5,6 ± 0,2	6,07 ± 0,29	6,47 ± 0,3*
ТВГЛУ	4,5 ± 0,6	4,5 ± 0,6	5,3 ± 0,5
Деструктивный ТБ	5,6 ± 0,8	4,9 ± 0,6	4,8 ± 0,7
Перфорин (нг/мл)			
Очаговый ТБ	38,4 ± 0,9	42,1 ± 1,3	38,3 ± 0,8
ТВГЛУ	39,15 ± 1,2	38,8 ± 1,6	39,1 ± 3,1
Деструктивный ТБ	33,8 ± 2,5	31,7 ± 1,6**	28,9 ± 2,3***
Кателицидин (мкг/мл)			
Очаговый ТБ	1,45 ± 0,15	1,6 ± 0,09	1,58 ± 0,08
ТВГЛУ	1,7 ± 0,13	1,65 ± 0,22	1,65 ± 0,23
Деструктивный ТБ	1,55 ± 0,2	1,6 ± 0,06	1,6 ± 0,36
Витамин Д связывающий протеин (мкг/мл)			
Очаговый ТБ	1,5 ± 0,08	1,4 ± 0,08	1,45 ± 0,07
ТВГЛУ	1,77 ± 0,1	1,77 ± 0,05	1,9 ± 0,09
Деструктивный ТБ	1,6 ± 0,1	1,53 ± 0,03	1,66 ± 0,1

Примечание. \*P = 0,02939 при сравнении с уровнем до начала химиотерапии; \*\*P = 0,00635 при сравнении с ТВГЛУ; \*\*\*P = 0,00012 при сравнении с очаговым ТБ; \*\*\*\*P = 0,017774 при сравнении с ТВГЛУ; \*\*\*\*\*P = 0,00138 при сравнении с очаговым ТБ.

**Таблица 3**

Динамические изменения уровня интерферона-гамма (ИНФ-γ) и фактора торможения миграции макрофагов (МИФ) у больных с различными клиническими формами туберкулеза в процессе проведения химиотерапии

Показатель / Группы больных	Сроки обследования		
	до начала химиотерапии	через 3 мес. химиотерапии	через 6 мес. химиотерапии
ИНФ-γ (пг/мл)			
Очаговый ТБ	–	4,7±3,4	15,5±7,6
ТВГЛУ	4,4 ± 2,4	13,1 ± 2,5*	10,0 ± 5,3
Деструктивный ТБ	4,6 ± 2,4	58,8 ± 8,7**	23,9 ± 7,6***
МИФ (пг/мл)			
Очаговый ТБ	2455,1 ± 522,9	2246,6 ± 366,8	952,2 ± 36,2*****
ТВГЛУ	837,3 ± 107,6****	1462,9 ± 384,7	1451,1 ± 252,9
Деструктивный ТБ	1439,0 ± 188,8	2122,7 ± 362,4	2572,2 ± 661,7

Примечание. \*P = 0,03471 при сравнении с уровнем до начала химиотерапии; \*\*P = 0,00824 при сравнении с уровнем до начала химиотерапии; \*\*\*P = 0,00915 при сравнении с уровнем до начала химиотерапии; \*\*\*\*P = 0,00965 при сравнении с очаговым ТБ; \*\*\*\*\*P = 0,011826 при сравнении с деструктивным туберкулезом; \*\*\*\*\*P = 0,00486 при сравнении с уровнем до начала химиотерапии.

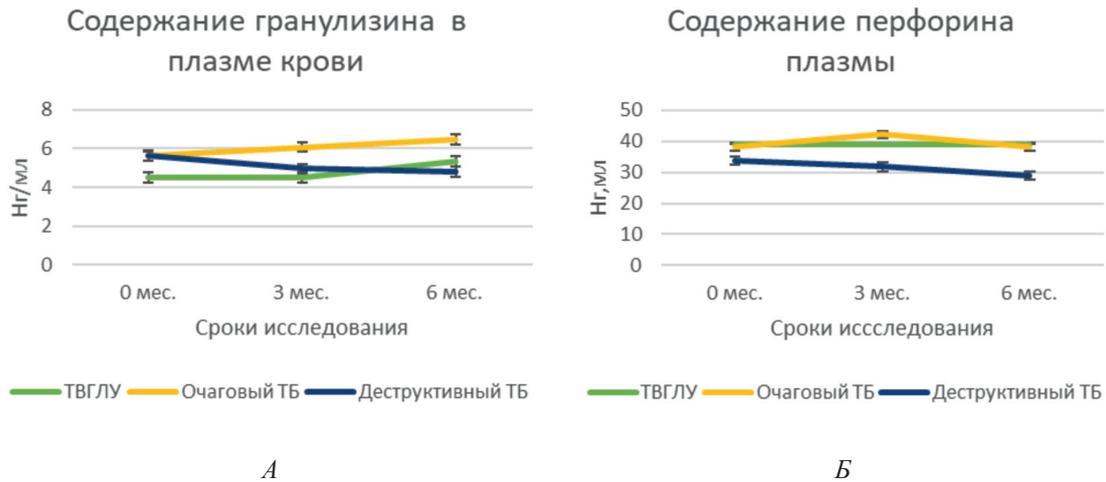


Рис. 1. Содержание гранулизина и перфорина в плазме крови больных на фоне проводимой противотуберкулезной химиотерапии

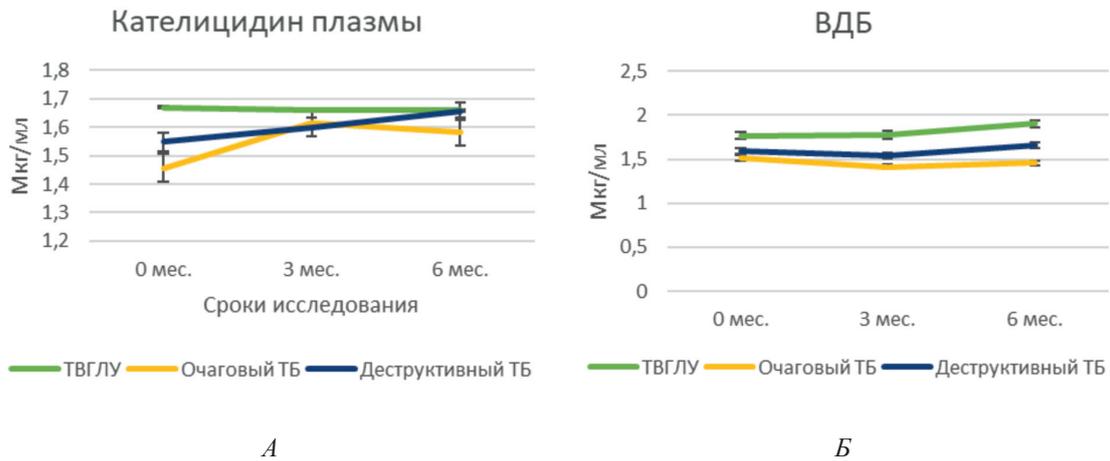


Рис. 2. Содержание кателицидина и ВДБ в плазме крови больных на фоне проводимой противотуберкулезной химиотерапии

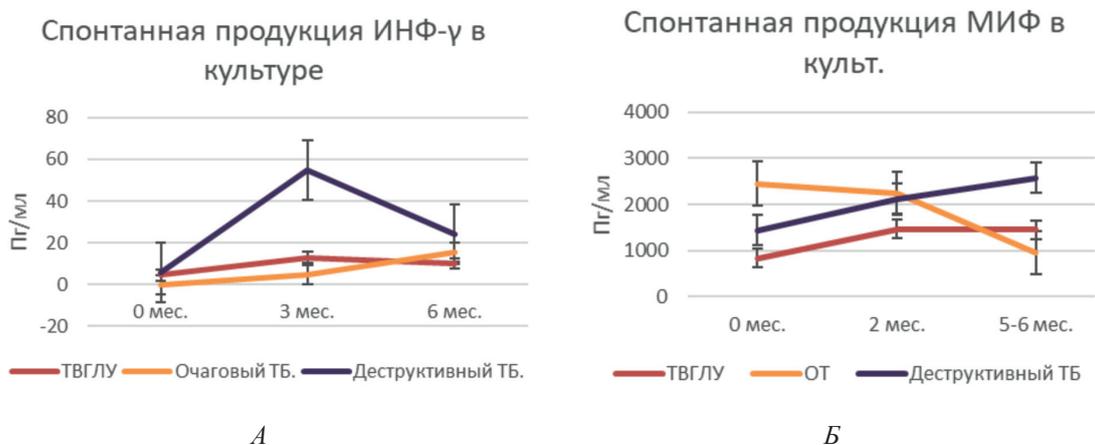


Рис. 3. Спонтанная продукция ИНФ-γ и МИФ в суточной культуре клеток крови больных на фоне проводимой противотуберкулезной химиотерапии

### Заключение

Сравнительная оценка содержания в плазме крови детей и подростков, больных различными формами туберкулеза органов дыхания, цитолитических молекул, характеризующих выраженность реакций врожденного звена противотуберкулезного иммунитета, показала достоверное снижение продукции перфорина у больных деструктивным туберкулезом по сравнению с группой инфицированных МБТ и отсутствие различий в продукции остальных факторов (гранулизин, кателицидин и ВДБ). Низкий уровень продукции перфорина сохранялся у больных с деструктивным туберкулезом, несмотря на проводимое лечение. Можно предположить, что к группе больных с деструктивным туберкулезом в отличие от «малых» форм относятся лица, несущие DRB1\*1501 аллель локуса гистосовместимости HLA-DR2, для которых описано значительное снижение общего числа перфорин-положительных клеток CD16<sup>+</sup> и CD56<sup>+</sup> клеток по сравнению с лицами, имеющими аллель DRB1\*1502 [12].

Достоверное увеличение содержания гранулизины плазмы крови показано нами только для группы больных очаговым туберкулезом, что в целом совпадает с литературными данными об увеличении его продукции у больных туберкулезом детей активным легочным туберкулезом после проведенного 4-х месячного курса химиотерапии. Однако авторами эти данные представлены для больных туберкулезом без разделения на клинические формы процесса [13].

Нами не выявлено достоверных различий и динамических изменений уровней кателицидина и ВДБ в исследованных группах больных, но делать вывод о малой значимости этих факторов врожденного иммунитета преждевременно, поскольку сравнение проводилось на небольших группах.

Увеличение продукции ИНФ- $\gamma$  у больных с деструктивным туберкулезом подтверждает аналогичные данные, полученные ранее в других исследованиях [8]. Сведения о его продукции у больных ТВГЛУ и очаговым туберкулезом описаны впервые и представляет интерес факт увеличения его выработки у больных ТВГЛУ к 3 мес. лечения, но отсутствие дальнейшей положительной динамики указывает на недостаточность его выработки для активизации функции макрофагов в элиминации микобактерий, персистирующих в ткани лимфоузлов больных [4]. Фактор

торможения миграции макрофагов (МИФ) был одним из первых гуморальных провоспалительных факторов инфекционного иммунитета, открытый одновременно В.Р. Bloom, В. Bennet (1966). Вариабельность его продукции у здоровых добровольцев и больных различными инфекционными заболеваниями обусловлена генетически и описана положительная корреляция доминантного аллельного полиморфизма в положении 173С с наличием и выраженностью туберкулеза [14]. Положительная и отрицательная динамика продукции МИФ у больных в зависимости от положительного, торпидного и прогрессирующего характера течения процесса описана нами ранее для различных форм деструктивного туберкулеза [10]. Можно предположить, что при очаговых формах туберкулеза генетически обусловленная изначальная продукция МИФ способствует локализации процесса, тогда как при ТВГЛУ его уровень и функциональная кооперация с другими провоспалительными цитокинами недостаточна для подавления роста и элиминации микобактерий из очагов поражения.

### Список литературы

1. Туберкулез органов дыхания. Руководство для врачей / Под ред. проф. Эргешева А.Э. – М., 2017. – С. 33–44.
2. Mustafa T., Leversen N.A., Sviland L., Wiker H.G. Differential in vivo expression of mycobacterial antigens in Mycobacterium tuberculosis infected lungs and lymph node tissues. BMC Infectious Diseases, 2014, Vol. 14, pp. 535. DOI: 10.1186/1471-2334-14-535.
3. Wolf A.J., Linas B.L., Trevejo-Nunez G.J., Kincaid E., Tamura T., Takatsu K., Ernst G.D. Mycobacterium tuberculosis Infects Dendritic Cells with High Frequency and Impairs Their Function In Vivo, J. Immunol., 2007, Vol. 179, pp. 2509–2519.
4. Zewdie O., Mihret A., Ameni G., Worku A., Gemechu T., Abebe T. Molecular typing of mycobacteria isolated from tuberculous lymphadenitis cases in Addis Ababa, Ethiopia., Int. J. Tuberc. Lung Dis., 2016, Vol. 20, no.11, pp. 1529–1534.
5. Abhimanyu Bose M., Varma-Basil M., Jain A., Sethi T., Tiwari P.K., Agrawal A., Banavaliker J.N., Bhowmick K.T. Establishment of Elevated Serum Levels of IL-10, IL-8 and TNF- $\beta$  as Potential Peripheral Blood Biomarkers in Tubercular Lymphadenitis. A Prospective Observational Cohort Study. PLoS ONE 2016, Vol. 11, no. 1: e0145576.
6. Andrea M. Cooper, Katrin D. Mayer-Barber, Alan Sher. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. Mucosal Immunol. 2011 May; 4(3): 252–260. DOI: 10.1038/mi.2011.13.
7. Rahman S., Gudetta B., Fink J., Granath A., Ashenafi S., Aseffa A., Derbew M., Svensson M., Andersson J., Grundstrom Brighenti S. Few CD8<sup>+</sup> Effector T Cells but Elevated Levels of FoxP3<sup>+</sup> Regulatory T Cells in the Granulomatous Lesions // Am. J. Pathol. 2009. V. 174. P. 2211–2224.
8. Akdis M., Alar A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R.A., Cramer R., Duan S.e.a. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor b, and TNF-a: Receptors, functions, and roles in diseases. J allergy clin immunol. 2016, V. 138, P. 984–1010.
9. Rajaram M.V., Ni B., Dodd C.E., Schlesinger L.S. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis.

Semin Immunol. 2014. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.010> (application: 16.06.2018).

10. Авербах М.М., Панова Л.В., Овсянкина Е.С. Продукция фактора торможения миграции макрофагов и интерлейкина 8 у детей и подростков при распространенных формах туберкулеза легких // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 8. – С. 43–47.

11. Авербах М.М., Горелова Л.А., Губкина М.Ф., Панова Л.В. Динамика спонтанного и антиген стимулированного синтеза INF- $\gamma$  при различных клинических формах туберкулеза у детей и подростков в процессе проведения химиотерапии. Актуальные проблемы туберкулеза // Материалы V межрегиональной научно-практической и учебно-методической конференции с международным участием, посвященной Всемирному дню борьбы с туберкулезом и памяти

чл.-кор. РАМН В.В. Ерохина (11 марта 2016 г., г. Тверь). – 2016. – С. 16–22.

12. Rajeswari D.N., Selvaraj P., Raghavan S., Jawahar M.S., Narayanan P.R. Influence of HLA-DR2 on perforin-positive cells in pulmonary tuberculosis // International Journal of Immunogenetics. 2007. V.34. P. 379–384.

13. Di Liberto D., Buccheri S., Caccamo N., Serena Meraviglia S., Amelia Romano A., Di Carlo P., Titon L., Francesco Dieli F., Krensky A.M., Salerno A. Decreased serum granulysin levels in childhood tuberculosis which reverse after therapy. Tuberculosis (Edinb). 2007. V. 87. P. 322–328.

14. Gomez L.M., Sanchez E., Ruiz-Narvaez E.A., Lopez-Nevot M.A., Anaya J.M., Martin J. Macrophage migration inhibitory factor gene influences the risk of developing tuberculosis in northwestern Colombian population. Tissue Antigens. 2007. V. 70. P. 28–33.