

УДК 616.2-002.5- 053.2:612.6.05

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ У ДЕТЕЙ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Н.В. Ставицкая

*ГОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет»,  
г. Краснодар, [stavitskaya@mail.ru](mailto:stavitskaya@mail.ru)*

В статье приведены результаты исследования локуса DRB1 главного комплекса гистосовместимости (HLA) и NRAMP1 у детей, проживающих на территории Краснодарского края. Установлено наличие положительных и отрицательных ассоциаций некоторых аллелей HLA DRB1 и генотипов NRAMP1 с заболеваемостью туберкулезом, что позволило рассматривать их как факторы устойчивости и предрасположенности к туберкулезу.

**Ключевые слова:** латентная туберкулезная инфекция, дети, генетика.

## RESEARCH OF GENETIC FACTORS IN CHILDREN WITH LATENT TUBERCULOSIS INFECTION

N.V. Stavitskaya

*Kuban State Medical University, Krasnodar, [stavitskaya@mail.ru](mailto:stavitskaya@mail.ru)*

The article provides the research results of locus DRB1 major histocompatibility (HLA) and NRAMP1 of children living Krasnodar region.

The existence of positive and negative associations of alleles HLA DRB1 and genotypes of NRAMP1 with the prevalence of tuberculosis is determined, with makes it possible to consider they as factors of either stability or predisposition to tuberculosis.

**Keywords:** latent tuberculosis infection, children, genetic.

В XXI век человечество вступило с высокой заболеваемостью туберкулезом. Предполагалось, что туберкулез останется одним из самых тяжелых заболеваний в мире до 2010 года [3]. Однако появление и быстрое распространение в мире туберкулеза с обширной лекарственной устойчивостью (XDR-TB) обусловило анонсирование новой стратегии ВОЗ, рассчитанной на период до 2015 года, центральным положением которой объявлено продолжение интенсивных исследований в области туберкулеза [9].

Ухудшение эпидемиологической ситуации привело к увеличению числа инфицированных туберкулезом лиц. Согласно официальным статистическим данным, за последнее 10-летие инфицированность туберкулезом детей в России увеличилась в 2,5 раза и в настоящее время в 10 раз превышает аналогичный показатель в развитых странах [1].

Персистирование жизнеспособных *M. tuberculosis* на протяжении всей жизни в зараженном организме определяет особенность

инфекционного процесса — как малую болезнь, с длительным скрытым течением и постоянной угрозой развития заболевания при снижении сопротивляемости инфекции [8].

Обобщенное представление об этапности в патогенезе туберкулеза [4] возродило интерес среди исследователей к проблеме латентной (скрытой) туберкулезной инфекции (ЛБТИ) в отличие от манифестной (явной).

Изучение методов диагностики ЛБТИ по Национальным руководствам 50-ти стран показало, что кожный туберкулиновый тест применяется с этой целью, однако определить угрозу прогрессирования инфекции по нему не представляется возможным [6]. Чувствительность кожного теста снижена у людей с иммунодефицитом, специфичность его ограничена перекрестными антигенами MBT и BCG, интерпретация затруднена в условиях массовой вакцинации BCG [5]. Такое же отношение высказали многие авторы и к недавно разработанному методу диагностики ЛБТИ *ex vivo* — IGRA, который измеряет продукцию IFN $\gamma$  в ответ на специфические антигены микобактерий туберкулеза [2]. Они пришли к выводу о том, что туберкулиновый кожный тест и IGRA «не различают» активную и латентную инфекцию. К тому же туберкулиновые пробы и результаты IGRA плохо коррелируют из-за позитивного результата кожного теста у лиц, вакцинированных BCG [7].

#### **Цель исследования**

Разработать способ определения риска прогрессирования латентной туберкулезной инфекции у детей с учетом генетической устойчивости/предрасположенности к заболеванию.

#### **Материалы и методы**

В ходе работы сформированы следующие клинические группы:

Дети славянской национальности, больные различными формами туберкулеза органов дыхания — 129 человек.

Дети с латентной туберкулезной инфекцией (ЛБТИ), здоровые инфицированные — 118 человек славянской национальности.

С целью формирования группы контроля для молекулярно-генетических исследований проведена случайная выборка из новорожденных популяции славянской национальности. Отобрано 109 здоровых новорожденных детей с отсутствием у родителей рентгенологических признаков локального туберкулеза органов дыхания.

Контролем для сравнительного исследования цитокинового профиля служили результаты исследования у 30 здоровых неинфицированных детей из регионального банка данных кафедры аллергологии и иммунологии КГМУ.

У всех детей проводили общепринятый комплекс клинико-лабораторного обследования с применением обязательных, дополнительных и факультативных методов исследования. В каждом случае обращали внимание на семейный анамнез и возможный контакт с больными туберкулезом.

Генотипирование локуса DRB1HLA и локуса INT4 NRAMP1 проводили по методике C. Søborg et al. (2002).

Концентрацию IL-4, IL-10, IL-18 и IFN- $\gamma$  определяли в сыворотке крови иммуноферментным методом с использованием наборов CYTELISA™ («Cytimmune», США). Оценку результатов проводили на имму-

ноферментном анализаторе ANTHOS 2010 (фирма «Becton Dickinson», США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики на основе анализа абсолютных и относительных величин. Наличие взаимосвязи между группами и ее достоверность оценивали с помощью статистики хи-квадрат, включающей поправку на непрерывность Йэйтса [<http://www.biometrika.tomsk.ru>]. Различия или показатели считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ . Обработку полученного материала проводили с использованием программ Microsoft Excel и STATISTICA.

#### Результаты исследования и их обсуждение

Исследование ассоциации антигенов системы HLA локуса DRB1 у детей, больных локальными формами туберкулеза органов дыхания, показало, что для них характерно увеличение частоты встречаемости аллельных специфичностей \*04 и \*16 по сравнению со здоровыми новорожденными детьми из популяции в 4,4 и 3,5 раза и здоровыми детьми, инфицированными микобактерия-

ми туберкулеза, в 2,2-1,6 раза соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис.1).

Частота встречаемости аллелей \*03 и \*11 среди здоровых новорожденных детей из популяции по сравнению с больными повышена: \*03 в 3,9, \*11 — в 5 раз, а среди здоровых, инфицированных МБТ — в 3,1 и в 3,9 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). Аллель \*12 встретились только у здоровых и совсем отсутствовала у больных детей. В то же время в группе больных туберкулезом органов дыхания и у здоровых, как новорожденных, так и инфицированных МБТ детей, установлена одинаковая (48,2 и 47,9% соответственно против 55,4%) частота встречаемости аллельных специфичностей гена HLA локуса DRB1 \*01, \*07, \*08, \*10, \*13, \*14, \*15 ( $p > 0,05$ ).

Полученные результаты исследования позволили нам рассматривать аллельные специфичности в генотипе HLA DRB1 \*03, \*11, \*12 как генетические факторы устойчивости, а \*04 и \*16 — как генетические факторы предрасположенности к заболеванию туберкулезом. Обнаруженные в значительном количестве аллельные специфичности

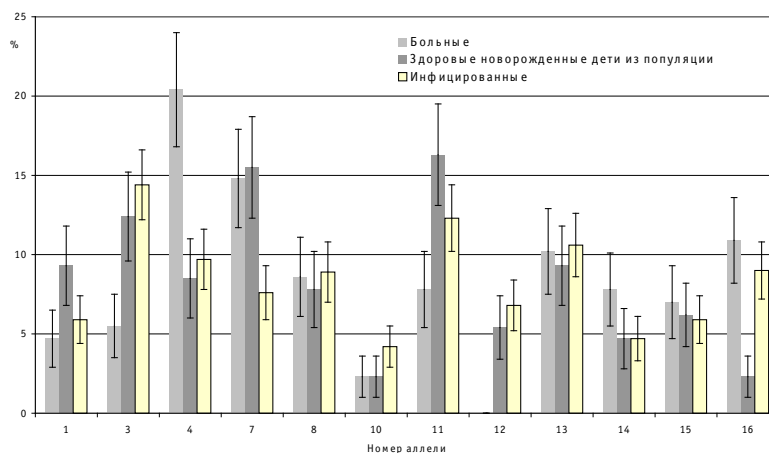


Рис. 1. Частота встречаемости аллелей гена HLA локуса DRB1 у больных туберкулезом, здоровых новорожденных из популяции и инфицированных МБТ детей

HLA DRB1, одинаково часто встречающиеся у больных и здоровых детей, мы назвали нейтральными и отнесли к этой группе аллели \*01, \*07, \*08, \*10, \*13, \*14, \*15.

Следует отметить полное отсутствие у жителей Краснодарского края специфичностей HLA DRB1 \*02, \*05, \*06, \*09.

Сравнительный анализ вариантов генотипа, то есть сочетания двух аллелей системы HLA DRB1 локуса, на устойчивость/предрасположенность у детей, заболевших локальным туберкулезом, в сравнении со здоровыми новорожденными из популяции и здоровыми, инфицированными МБТ показал, что для больных больше характерен наследственный фактор парности двух аллелей DRB1 \*04/\*04, \*04/\*16, \*16/\*16 с маркерным признаком предрасположенности к заболеванию (17,8%), тогда как у здоровых новорожденных детей из популяции подобные наследственные компоненты вообще не обнаружены, а у здоровых инфицированных МБТ, составили 9,3% ( $p < 0,05$ ).

Кроме того, среди больных детей сочетание специфичностей с признаками, ассоциированными с высокой вероятностью развития туберкулеза — DRB1 \*04 и \*16, с аллелями, имеющими другие признаки (устойчивости, нейтральности), обнаружено в 2 раза чаще по сравнению с группой здоровых новорожденных и здоровых, инфицированных МБТ детей ( $38,0 \pm 4,2$  против  $18,3 \pm 3,7$  и  $18,6 \pm 3,5$  соответственно,  $p < 0,05$ ).

Наличие в генотипе здоровых новорожденных из популяции и здоровых, инфицированных МБТ детей, сочетания антигенов HLA, которые обуславливают устойчивость к туберкулезу — DRB1 \*03, \*11, \*12 в 5,5

и 4,3 раза ( $61,5 \pm 4,6$  и  $53,4 \pm 4,5$  соответственно против  $12,5 \pm 2,5\%$ ,  $p < 0,05$ ) превышает таковую у больных. Одновременно генотип, состоящий из двух разных специфичностей, включающий аллель с маркерным признаком предрасположенности, встречается в 4 и 3 раза чаще у больных по сравнению со здоровыми новорожденными детьми из популяции и здоровыми, инфицированными МБТ ( $55,8 \pm 4,3$  против  $18,3 \pm 3,7$  и  $18,6 \pm 3,5\%$ ,  $p < 0,05$ ). В то же время у здоровых детей по сравнению с больными, сочетания специфичностей с маркерным признаком устойчивости и с признаком нейтральности обнаружены чаще в 7,8 и 6 раза соответственно ( $36,7$  и  $30,5$  против  $4,7\%$ ,  $p < 0,05$ ), что может свидетельствовать о разграничении «значимого» и «незначимого» антигена HLA, определяющего устойчивость/предрасположенность к заболеванию.

Вместе с тем существенной разницы между изучаемыми показателями в контрольной группе новорожденных из популяции и в группе здоровых, инфицированных МБТ детей не установлено, кроме полного отсутствия генотипа HLA DRB1 с наличием обеих аллелей предрасположенности к заболеванию у новорожденных.

Генетическое сочетание аллелей, наделенных маркерными признаками нейтральности — DRB1 \*01, \*07, \*08, \*10, \*13, \*14, \*15, обнаруживалось у больных так же часто, как и у здоровых новорожденных детей из популяции и здоровых, инфицированных МБТ ( $36,4$  против  $26,6$  и  $28,0\%$ ,  $p > 0,05$ ).

Анализ вариантов генотипа DRB1 с сочетанием антигенов устойчивости и предрасположенности показал, что количественный показатель сочетания этих наследственных

компонент только у здоровых новорожденных детей из популяции существенно превосходит таковой у больных (11,9 против 4,7%,  $p < 0,05$ ).

Таким образом, результаты исследования позволяют прийти к выводу о влиянии наследственной компоненты HLA DRB1 локуса на прогрессирование возникшей туберкулезной инфекции.

В ходе изучения ассоциации полиморфизмов генов-кандидатов проведено исследование одной из самых распространенных мутаций гена NRAMP1 — в интроне 4 (INT4).

Прежде всего мы установили частоту встречаемости аллельных специфично-

стей NRAMP1 INT4 у наблюдаемых детей (табл. 1).

Из представленного видно, что аллель G в локусе INT4 гена NRAMP1 обнаружена в 68,3% случаев. Аллель C вообще более редко встречается — на нее приходится 31,7%, что в 2,2 раза меньше по сравнению с аллелью G. В то же время у здоровых детей показатель частоты встречаемости аллели C существенно выше (38,1%) по сравнению с больными, у которых она встретилась в 20,5% ( $p < 0,05$ ). Несмотря на то, что аллель G отличается более частой встречаемостью у всех детей, все же разница между здоровыми и больными детьми прослеживается. В частности,

Таблица 1

**Частота встречаемости аллельных специфичностей NRAMP1 локуса INT4 у здоровых и больных туберкулезом детей (% ,  $M \pm m$ ),  $n=356$**

Аллели NRAMP1	Частота встречаемости аллельных специфичностей							
	у здоровых новорожденных детей из популяции		у здоровых инфицированных МБТ детей		у больных туберкулезом детей		всего	
	абс.	% $\pm m$	абс.	% $\pm m$	абс.	% $\pm m$	абс.	% $\pm m$
C	83	38,1 $\pm$ 2,3**	90	38,1 $\pm$ 3,1**	53	20,5 $\pm$ 2,5	226	31,7 $\pm$
G	135	61,9 $\pm$ 2,3	146	61,9 $\pm$ 3,1	205	79,5 $\pm$ 2,8*	486	68,3 $\pm$
Итого	218	100	236	100	258	100	712	100

\* достоверность по отношению к здоровым,  $p < 0,05$ ;

\*\* достоверность по отношению к больным,  $p < 0,05$

у больных детей она встретилась в 79,5% случаев, у здоровых — в 61,9%.

Исследование наиболее часто встречаемых генотипов NRAMP1 — в интроне 4 (INT4) — C/C, C/G и G/G показало, что среди здоровых детей, как новорожденных из популяции, так и инфицированных МБТ, встречается генотип C/G на 14,8% — 13,1% (55,9 и 54,2

против 41,1%,  $p < 0,05$ ) чаще по сравнению с больными. В то же время гомозиготный генотип C/C у детей с локальным туберкулезом не был обнаружен вовсе, а в группе здоровых он встретился в 10,2% и 11,0% случаев соответственно (рис. 2). Гомозиготный генотип G/G более часто (на 25,0 и 24,1% соответственно) обнаружен у больных детей,

по сравнению со здоровыми при этом различие достоверно ( $p < 0,05$ ).

С целью получения дополнительных сведений о роли генов-кандидатов в формиро-

вании наследственной компоненты устойчивости/ предрасположенности к туберкулезу мы провели сопоставительный анализ частоты встречаемости аллельных специфич-

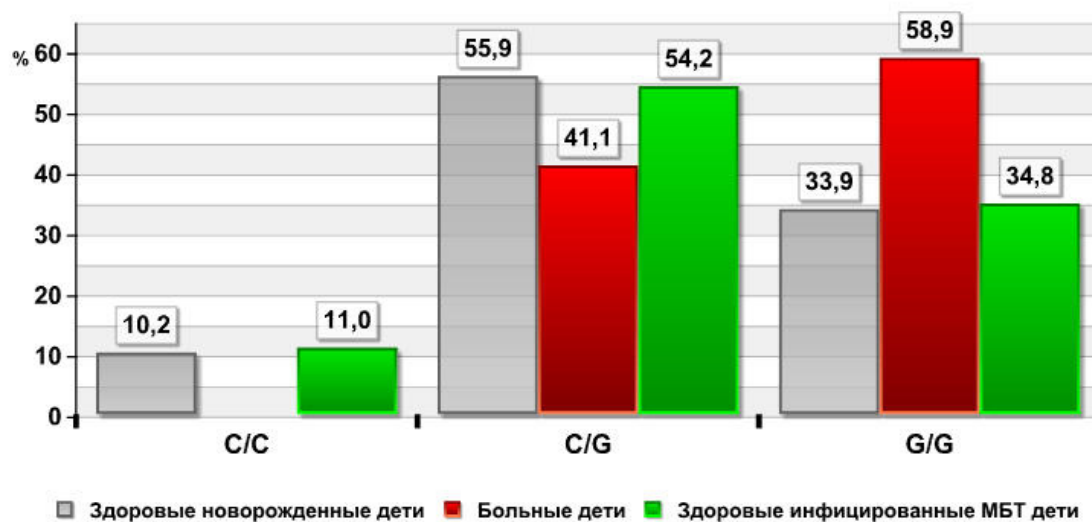


Рис. 2. Частота встречаемости генотипов локуса INT 4 гена NRAMP 1 у больных туберкулезом и здоровых детей

ностей NRAMP1 среди детей, у которых в HLA системе преобладающими являются те или иные антигены. Так, в 53,9% случаев встречаемости HLA аллелей устойчивости регистрируется вариант C/G NRAMP1,

в 31,1% — вариант G/G и в 15,0% — вариант C/C. Из всех случаев встречаемости аллелей предрасположенности в 57,6% обнаружен вариант G/G, в 42,4% — вариант C/G (табл. 2).

Таблица 2

Соотношение аллельных специфичностей HLA локуса DR B1 и генотипов NRAMP 1  
INT4 n=356 (% , M±m)

Генотипы NRAMP1 INT4	Аллельные специфичности системы HLA DRB1							
	устойчивости		предрасположенности		нейтральности		Всего	
	абс.	%±m	абс.	%±m	абс.	%±m	абс.	%±m
C/G n=178	104	53,9±3,5	67	42,4±3,9	185	51,2±2,6	356	50,0±1,8
G/G n=154	60	31,1±3,3	91	57,6±3,9	157	43,5±2,6	308	43,3±1,8
C/C n=24	29	15,0±2,5	-	-	19	5,3±1,1	48	6,7±0,9
Итого	193	100	158	100	361	100	712	

Очевидно, что генотип G/G в локусе INT4, существенно чаще сочетающийся с аллелями HLA DRB1, предрасполагающими к заболеванию, может быть одним из главных претендентов на прогностический индикатор прогрессирования возникшей туберкулезной инфекции. В противоположность этому генотипы C/C и C/G, обнаруживаемые в 68,9±3,3% случаев в сочетании с аллелями устойчивости, по-видимому, обладают возможностью стабилизировать возникшую туберкулезную инфекцию путем ограничения репликации микобактерий.

#### Выводы

Исследование генетических факторов главного комплекса гистосовместимости (HLA) и гена естественного, связанного с резистентностью белка макрофагов (NRAMP1), позволяет определить, насколько реальна угроза прогрессирования туберкулезной инфекции у детей после ее возникновения.

Генетическая предрасположенность к туберкулезу у детей славянской национальности Краснодарского края связана с аллелями \*04 и \*16, генетическая устойчивость — с аллелями \*03, \*11, \*12 системы HLA локуса DR B1.

Исследование гена-кандидата NRAMP1 показало, что генотип C/C локуса INT4 является наследственной компонентой, определяющей устойчивость к туберкулезной инфекции. Сочетание генотипа G/G локуса INT4 гена NRAMP1 со специфичностями гена HLA, которым присущи признаки предрасположенности к заболеванию — \*04 и \*16 и нейтральности — \*01, \*07, \*08, \*10, \*13, \*14, \*15, определяет высокий уровень

риска прогрессирования туберкулезной инфекции.

#### Список литературы

1. Аксенова В.А. Внелегочные формы туберкулеза у детей в России // Репродуктивное здоровье детей и подростков: научно-практический журнал. — 2007. — N 3. — С. 21–25.
2. Bakir M., Millington K.A., Soyak A. et al. Prognostic value of a T-cell-based, interferon- $\gamma$  biomarker in children with tuberculosis contact. // *Ann. Intern. Med.* — 2008; 149: 777–787.
3. Dye C. Tuberculosis 2000-2010: control, but not elimination. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2000; 4 (Suppl.). — P. 146–52.
4. Dannenberg A.M., Jr. Immune mechanisms in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis // *Rev. Infect. Dis.* — 1989. — 11(Suppl. 2). — P. 369–378.
5. Lalvani A., Millington K.A. T-cell based diagnosis of childhood tuberculosis infection. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* — 2007; 20:264–271.
6. Mack U., Migliori G.B., Sester M. et al. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to M. tuberculosis? A TB-NET consensus statement // *Eur. Respir. J.* — 2009; 33: 956–973.
7. Pai M., Menzies D. Interferon- $\gamma$  release assays: what is their role in the diagnosis of active tuberculosis? // *Clin. Infect. Dis.* — 2007; 44: 74–77.
8. Rook G.A., Zumla A. Advances in the immunopathogenesis of pulmonary tuberculosis // *Curr Opin Pulm Med.* — 2001; 7: 116–123.
9. World Health Organization. Guidelines for management of drug-resistant Tuberculosis. WHO/HTM/TB/2006.361. — Geneva, World Health Organization, 2006.