

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ДИАГНОСТИКЕ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЙ ЛЕГКИХ

Аннотация. С целью повышения эффективности диагностики диссеминированного туберкулеза легких у 43 больных с трудностями верификации диагноза туберкулеза легких определяли спонтанную и индуцированную антигеном *M. bovis* (BCG) продукцию фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) периферическими мононуклеарными клетками крови и уровень антител к *M. tuberculosis* в сыворотке крови. Установлено достоверное повышение стимулированной *M. bovis* (BCG) продукции ФНО- α и увеличение уровня антимикобактериальных антител у больных туберкулезом по сравнению с пациентами с саркоидозом и другими интерстициальными заболеваниями легких. Это может служить дополнительными критериями, подтверждающими туберкулезную этиологию патологического процесса.

Ключевые слова: туберкулез, саркоидоз, фактор некроза опухолей-альфа, антитела, диагностика.

Abstract. Increase of efficiency of diagnostics of disseminated pulmonary tuberculosis. We researched 43 patients with difficulties of verification of the diagnosis. We studied the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) by peripheral mononuclear blood cells (spontaneous and in response to *M. bovis* /BCG/) and level of antibodies against *M. tuberculosis* in serum. It was found increase of production TNF- α , in vitro in response to *M. bovis* (BCG) and increase of antibodies level against *M. tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in comparison with patients with sarcoidosis and others disseminated pulmonary diseases. This can serve as additional criteria confirming a tubercular etiology of pathological process.

Keywords: a tuberculosis, sarcoidosis, tumor necrosis factor- α , an antibody, diagnostics.

В последние годы отмечается увеличение числа больных с диссеминированными (интерстициальными) заболеваниями легких. Это связано не только с улучшением качества диагностики, но и с истинным ростом заболеваемости [1, 2]. По-прежнему сохраняется высокий процент диагностических ошибок при диссеминированных процессах в легких [3]. Атипичность клинко-рентгенологической картины, отсутствие микобактерий туберкулеза, нормергические и отрицательные результаты туберкулиновых проб, невозможность в ряде случаев использования морфологических методов верификации диагноза приводят к трудностям дифференциальной диагностики диссеминированного туберкулеза легких с другой легочной патологией [4]. Это заставляет исследователей искать новые подходы к диагностике этих заболеваний.

В противоинфекционной защите организма от внутриклеточной инфекции велика роль провоспалительных цитокинов, в том числе фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) [5]. Он имеет значение в формировании гранулем и продукции макрофагальной активности [6, 7], ограничении размножающейся микобактериальной популяции на ранних стадиях иммунного ответа [5]. С нарушением продукции этого цитокина связывают такие клинические проявления туберкулезной инфекции, как лихорадка, потеря в весе, тканевые повреждения, формирование геморрагического некроза и др. [8].

Целью исследования было выявление дополнительных критериев дифференциальной диагностики диссеминированного туберкулеза с другими интерстициальными заболеваниями легких на основе использования иммунологических методов, а именно определения продукции ФНО- α и уровня специфических антител к *M. tuberculosis*.

Материалы и методы исследования

Под наблюдением находились 43 больных с интерстициальными заболеваниями легких различной этиологии, имевших трудности в верификации диагноза. Из них мужчин – 14, женщин – 29, возраст от 22 до 60 лет. После комплексного клинико-рентгенологического, микробиологического и, в ряде случаев, гистологического обследования диагноз диссеминированного туберкулеза легких установлен у 13 человек (группа 1), саркоидоза легких – у 12 (группа 2), диссеминации другой этиологии (фиброзирующий альвеолит, метастатические поражения легких, пневмокониозы, двусторонние пневмонии) – у 18 человек (группа 3). В качестве контроля обследовано 16 здоровых лиц.

У пациентов групп 1 и 2 проводили определение спонтанной (не стимулированной) и индуцированной антигеном *M. bovis* (BCG) продукции фактора некроза опухолей- α (ФНО- α) в супернатантах культур периферических мононуклеарных клеток крови. ФНО- α определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием двух моноклональных антител (тест-система Белорусского НИИ гематологии и переливания крови). Супернатанты культур мононуклеарных клеток получали путем краткосрочного (24 ч) культивирования мононуклеаров, выделенных из периферической венозной крови на градиенте плотности фиколл-урографин ($\rho = 1,114$ г/см при 200g). Культивирование клеток осуществляли в среде RPMI (Flow Laboratories), содержащей 10 % инактивированной нагреванием эмбриональной телячьей сыворотки, 2 mM глутамина и по 100 ед/мл пенициллина и стрептомицина при $t = 37^\circ\text{C}$ в атмосфере повышенной влажности и CO_2 . В качестве специфического стимулятора использовали *M. bovis* (BCG), предварительно культивированные на среде Левенштейна-Иенсена, в рабочей концентрации 50 мкг/мл. Концентрацию ФНО- α вычисляли путем построения калибровочной кривой по результатам титрования рекомбинантного ФНО- α и выражали в пг/мл. Рассчитывали разность между индуцированной и спонтанной продукцией ФНО- α (Δ BCG).

Дополнительно у всех пациентов проводили определение суммарных (Ig A, M, G) антител к антигенам *M. tuberculosis* в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа с применением тест-систем АТ-Туб-Бест-стрип (ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск). Учет результатов осуществляли путем измерения оптической плотности на многоканальном иммуноферментном анализаторе марки «Линкэй» (г. Санкт-Петербург, НПО «Научные приборы»).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием компьютерных программ Microsoft® Excel для Windows^{xp}® и Statistica-6. Использовали методики описательной статистики (среднее арифметическое (M), ошибка средней арифметической (m), интервал колебаний, медиана) и специальные статистические методики (метод корреляции Спирмена). Сравнение двух независимых групп, подчиняющихся нормальному распределению, проводили с помощью t -критерия Стьюдента, а не подчи-

няющихся нормальному распределению – с помощью теста Вилкоксона. В качестве критического уровня достоверности был принят критерий 0,05.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных исследований установлен достоверно более высокий уровень индуцированной антигеном *M. bovis* (BCG) продукции фактора некроза опухолей- α периферическими мононуклеарными клетками крови у больных диссеминированным туберкулезом легких (группа 1) (среднее значение Δ BCG составило $1129,0 \pm 389$ пг/мл, интервал колебаний 0–3500 пг/мл, медиана – 500) по сравнению с больными саркоидозом легких (группа 2) (среднее значение Δ BCG – $266,2 \pm 99,4$ пг/мл, интервал колебаний от 0 до 1230 пг/мл, медиана – 138), $p_{1-2} = 0,0500$. Спонтанная (не индуцированная антигеном) продукция ФНО- α также была выше у больных диссеминированным туберкулезом легких $927,8 \pm 345$ пг/мл (интервал колебаний 100–4666 пг/мл, медиана – 500) по сравнению с больными саркоидозом легких $581,5 \pm 255$ пг/мл (интервал колебаний 60–2550 пг/мл, медиана – 150). Однако из-за большого размаха индивидуальных значений спонтанной продукции ФНО- α различия в группах 1 и 2 недостоверны ($p_{1-2} = 0,44$), но в обеих группах спонтанная продукция ФНО- α была достоверно выше $927,8 \pm 345$ пг/мл (группа 1) и $581,5 \pm 255$ пг/мл (группа 2), чем у здоровых ($176,8 \pm 52$ пг/мл, интервал колебаний 0–710 пг/мл, медиана – 106), $p_{1-3} = 0,038$ и $p_{2-3} = 0,0038$ (табл. 1).

Таблица 1
Средние статистические значения уровня продукции ФНО- α у больных диссеминированным туберкулезом, саркоидозом легких и здоровых

Показатели ($M \pm m$)	Диссеминированный туберкулез легких (группа 1) $n = 13$	Саркоидоз легких (группа 2) $n = 12$	Здоровые $n = 16$	p
Спонтанная продукция ФНО- α (пг/мл)	$927,8 \pm 345$	$581,5 \pm 255$	$176,8 \pm 52$	$p_{1-2} = 0,44$ $p_{1-3} = 0,038$ $p_{2-3} = 0,0038$
Индуцированная <i>M. bovis</i> продукция ФНО- α (Δ BCG)	1129 ± 389	$266,2 \pm 99,4$	$435,7 \pm 124$	$p_{1-2} = 0,050$ $p_{1-3} = 0,18$ $p_{2-3} = 0,11$

При анализе клинико-лабораторных данных создалось впечатление, что уровень спонтанной продукции ФНО- α периферическими мононуклеарными клетками крови зависит от степени активности патологического процесса и выраженности симптомов интоксикации. В связи с этим авторами дополнительно проведено изучение корреляционной зависимости спонтанной продукции ФНО- α и выраженности лихорадочной реакции, а также взаимосвязи продукции ФНО- α с некоторыми гематологическими показателями (величина СОЭ и процент лимфоцитов). Так, лихорадочная реакция на момент обследо-

вания отмечалась у девяти из 13 (69,2 %) больных диссеминированным туберкулезом и у двух из 12 (16,6 %) больных саркоидозом легких. У больных диссеминированным туберкулезом легких установлена прямая, высокой тесноты корреляционная связь между уровнем спонтанной продукции ФНО- α и выраженностью лихорадочной реакции с коэффициентом корреляции $r = 0,81$ ($p < 0,01$), скоростью оседания эритроцитов с коэффициентом корреляции $r = 0,77$ ($p < 0,05$) и обратная средней степени связь с относительным содержанием лимфоцитов в периферической крови $r = -0,69$ ($p < 0,05$). При этом у больных саркоидозом не установлено достоверной корреляционной зависимости между величиной спонтанной продукции ФНО- α и гематологическими показателями (процент лимфоцитов и СОЭ) в капиллярной крови. Изучение корреляционной зависимости продукции ФНО- α с уровнем лихорадки у больных саркоидозом не проводилось в связи с ее отсутствием у большинства больных. Полученные данные подтверждают предположение [9], что, несмотря на сходную макрофагальную активацию, наблюдающуюся при обоих гранулематозных заболеваниях (туберкулез и саркоидоз), освобождение ФНО- α только при туберкулезе является причиной тканевых повреждений. Микобактерии туберкулеза не только запускают освобождение ФНО- α макрофагами, но и делают клетки организма более чувствительными к токсическому эффекту цитокинов [9].

При исследовании уровня антител к *M. tuberculosis* установлено, что у 92,3 % больных группы 1 наблюдается повышенный уровень антимикобактериальных антител. Среднее значение оптической плотности (ОП) образцов сыворотки крови пациентов с диссеминированным туберкулезом составило $0,398 \pm 0,088$ (интервал колебаний 0,01–1,24, медиана – 0,35). В то же время у больных саркоидозом легких (группа 2) и диссеминациями другой этиологии (группа 3) обнаружен низкий уровень антител к *M. tuberculosis*. Среднее значение ОП у пациентов группы 2 составило $0,012 \pm 0,006$ (интервал колебаний 0–0,28, медиана – 0), в группе 3 – $0,063 \pm 0,03$ (интервал колебаний 0–0,4, медиана – 0,04), что достоверно ниже, чем у больных диссеминированным туберкулезом легких $0,398 \pm 0,088$, медиана – 0,35 ($p_{1-2} = 0,0058$; $p_{1-3} = 0,0033$) и не отличается от уровня ОП у здоровых $0,058 \pm 0,01$, медиана – 0 ($p > 0,05$) (табл. 2).

Таблица 2

Уровень антител к *M. tuberculosis* в сыворотке крови больных с диссеминированными заболеваниями легких

Группы обследованных	Число наблюдений, n	Уровень антител к <i>M. tuberculosis</i> (ОП)			
		($M \pm m$)	Интервал	Медиана	p
Диссеминированный туберкулез легких (группа 1)	13	$0,398 \pm 0,088$	0,01–1,24	0,35	$p_{1-2} = 0,0058$
Саркоидоз легких (группа 2)	12	$0,012 \pm 0,006$	0–0,28	0	
Диссеминации другой этиологии (группа 3)	18	$0,063 \pm 0,03$	0–0,4	0,04	$p_{1-3} = 0,0033$

Таким образом, повышение индуцированной специфическим антигеном *M. bovis* (BCG) продукции ФНО- α периферическими мононуклеарными клетками крови и увеличение уровня антимикобактериальных антител у больных диссеминированным туберкулезом легких могут служить дополнительными критериями, подтверждающими туберкулезную этиологию патологического процесса в трудных случаях диагностики интерстициальных заболеваний легких.

Список литературы

1. **Ильченко, В. А.** Диссеминированные (диффузные) процессы в легких / В. А. Ильченко // Диагностика и лечение внутренних болезней / под ред. Ф. И. Комарова. – М. : Медицина, 1991. – Т. 2. – С. 229–250.
2. **Абумуслимова, Е. А.** Структура и причины инвалидности больных интерстициальными заболеваниями легких / Е. А. Абумуслимова, Н. О. Григорьева // Актуальные проблемы медицинской науки и образования : труды II межрегиональной научной конференции (24–25 апреля 2009 г.). – Пенза : Информационно-издательский центр ПензГУ, 2009. – С. 5–6.
3. **Мишин, В. Ю.** Диагностика и дифференциальная диагностика гематогенно-диссеминированного туберкулеза легких / В. Ю. Мишин, О. В. Демихова, Н. В. Кузьмина // Consilium medicum. – 2002. – Т. 4. – № 9. – С. 498–506.
4. **Николаева, Г. М.** Диагностика диссеминированного туберкулеза и других гранулематозных заболеваний легких (клинико-лабораторное исследование) : автореф. дис. ... д-ра. мед. наук / Г. М. Николаева. – М., 2004. – 44 с.
5. **Bekker, L. G.** TNF- β controls intracellular mycobacterial growth by both inducible nitric oxide synthase-dependent and inducible nitric oxide synthase-independent pathways / L. G. Bekker, S. Freeman, P. J. Murray [et al.] // J. Immunol. – 2001. – V. 166. – P. 6728.
6. **Dinarello, C. A.** Proinflammatory cytokines / C. A. Dinarello // Chest. – 2000. – V. 118. – P. 503–508.
7. **Kaufmann, S. H. E.** Protection against tuberculosis: cytokines, T cells and macrophages / S. H. E. Kaufmann // Ann. Rheum. Dis. – 2002. – V. 61 (suppl. 2). – P. 1154–1158.
8. **Rook, G. A. W.** The role of cytokine in the immunopathology of tuberculosis and the regulation of agalactasyl Ig G / G. A. W. Rook, R. Al. Attivan // Lymphokine Res. – 1989. – V. 8. – P. 323–332.
9. **Rook, G. A. W.** Cytocines and the Koch phenomenon / G. A. W. Rook, R. Al. Attivan // Tubercle. – 1991. – V. 72. – P. 13–20.

Салина Татьяна Юрьевна

доктор медицинских наук, доцент,
кафедра фтизиатрии ФПК и ППС,
Саратовский государственный медицинский университет

Salina Tatyana Yuryevna

Doctor of medical sciences, associate
professor, sub-department of phthisiology,
department of advanced education
and professional retraining,
Saratov State Medical University

E-mail: SalinaTU@rambler.ru

УДК 577.156.6+616-002.5

Салина, Т. Ю.

Иммунологические методы в диагностике диссеминированных поражений легких / Т. Ю. Салина // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2010. – № 3 (15). – С. 86–90.