

Зинченко

Юлия Сергеевна

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
АУТОИММУННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ И
САРКОИДОЗЕ ЛЕГКИХ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

14.01.16 – фтизиатрия

14.01.25 – пульмонология

Санкт-Петербург, 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук Старшинова Анна Андреевна

доктор медицинских наук, профессор Яблонский Петр Казимирович

Официальные оппоненты:

Мишин Владимир Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фтизиатрии и пульмонологии, заведующий

Шмелев Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», отдел дифференциальной диагностики туберкулеза легких и экстракорпоральных методов лечения, руководитель

Ведущее учреждение: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» декабря 2019 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 208.092.01 при ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России (191036, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2/4, тел. (812) 579-25-54).

С диссертацией можно ознакомиться на официальном сайте www.spbniif.ru ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России и в научной библиотеке (191036, г. Санкт-Петербург, Лиговский пр., д.2/4, тел.(812) 579-25-87)

Автореферат разослан «_____» _____ 2019 г.

Секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Виноградова Татьяна Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Клиническая картина некоторых гранулематозных заболеваний достаточно однообразна, но их течение, степень эпидемиологической опасности, варианты лечения и прогноз для жизни разнятся (Илькович М.М., 2016; Чучалин А.Г., 2017). Выявление этиологического фактора и знание патогенеза заболевания в подобных ситуациях является ключевым моментом в выборе тактики ведения пациента (Ариэль Б.М., 2017; Patterson K., 2018). Основным доказательством туберкулезного процесса является выделение *M.tuberculosis* с помощью бактериологических методов диагностики (Вишневский Б.И., 2015; Нарвская О.В., 2016), что определяет основной принцип противотуберкулезной терапии – воздействие на возбудитель.

В отличие от туберкулеза саркоидоз является одним из немногих заболеваний, схожих с ним по своим характеристикам, но с неустановленной этиологией, что приводит к большому числу диагностических ошибок и к отсутствию единой тактики ведения пациентов (Визель И.Ю., 2017; Визель А.А., 2018; Fischer A., 2015; Glaziou P., 2015; Elkington P., 2016).

Начиная с 70-х годов прошлого столетия многие исследователи пытались доказать связь туберкулеза и саркоидоза, что основывалось на выявлении компонентов микобактерий и антител к ним у больных саркоидозом (Хоменко А.Г., 1996; Scadding J.G., 1960; Moscovic E.A., 1978), а также служило поводом для назначения им противотуберкулезной терапии. В настоящее время роль микобактерий туберкулеза как основного этиологического фактора саркоидоза не подтверждена, но продолжается их изучение в качестве одного из триггерных факторов, «запускающих» механизм аутоиммунного воспаления (Shoenfeld Y., Bindoli S. et al., 2016; Sudres M. et al., 2018; Korsten P., 2018). Влияние микобактерий на развитие саркоидных гранул было выявлено в экспериментальных исследованиях (Lewis крысы и C57BL/6 мыши) (Hu Y. et al., 2017).

Поиск характерных признаков аутоиммунного воспаления при саркоидозе привел к выявлению различных антител (антимитохондриальных антител, антиядерных антител, ревматоидного фактора, антител к виментину и т.д.) (Kobak S., 2015; Zissel G., 2016). В ряде исследований в сыворотке

крови и в бронхоальвеолярной жидкости у пациентов с саркоидозом были обнаружены аутоантитела к виментину (филаментный белок мезенхимальных клеток), который играет значимую роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний (Musaelyan A., 2018; Kinloch AJ, 2018). Результаты проведенных исследований послужили поводом для изучения эффективности препаратов, применяемых в терапии ревматологической патологии, в том числе ингибиторов ФНО-альфа (инфиликсимаба, адалимумаба) и цитостатических препаратов (метотрексата, лефлуномида, азатиоприна) при саркоидозе легких (Визель А.А., 2019; LeV., 2018; Patterson K., 2018).

Наличие параспецифических реакций, таких как ревматоид Понсе, реактивный неспецифический артрит, увеит, узловатая эритема и других, при туберкулезе свидетельствует о наличии аутоиммунного воспаления и при туберкулезе (Elkington P., 2016). В последние годы были получены данные о снижении уровня аутоантител на фоне противотуберкулезной терапии (Elkayam O., 2013; Zumla A., 2015).

Таким образом, определение клинико-иммунологических характеристик аутоиммунного воспаления при саркоидозе и туберкулезе, а также понимание его роли в патогенезе развития и особенностей клинического течения указанных заболеваний позволит определить тактику ведения больных и улучшить результаты их лечения с учетом полученных данных.

Степень разработанности темы

Развитие саркоидоза может быть проявлением аутоиммунного провоспалительного синдрома, индуцированного адьювантами (АСИА), который наряду с аутоиммунными заболеваниями, развивается под влиянием различных экзогенных и эндогенных триггерных факторов (Bindoli S., 2016; Watad A., 2018; Perricone C., Shoenfeld Y., 2019).

Одной из характерных черт аутоиммунного воспаления является формирование антител (Москалев А.В., 2017). В настоящее время особое внимание при саркоидозе уделяется исследованию виментина, который рассматривается как наиболее вероятный аутоантиген (Zissel G., 2015; Mortaz E., 2016).

До настоящего времени не было получено достаточно убедительных данных о различиях Т-клеточного звена иммунитета при туберкулезе и саркоидозе (Jiao J. et al., 2015; Patterson K.C., 2018). При этом роль В-клеточного звена иммунного ответа, ассоциированного с аутоиммунной патологией, при данных заболеваниях изучена мало (Korta D.Z., 2015; Sah V.P., 2016; James W.E., 2018). Исследования последних лет показывают значимость сывороточных иммуноглобулинов в формировании гранулем путем присоединения их к иммунным комплексам (Кораблев П.В. и соавт., 2015; Timmermans W.M.C., 2016). Однако работ, посвященных изучению формирования иммунных комплексов после индукции их специфическими антигенами при туберкулезе и саркоидозе, не проводилось.

Цель исследования – улучшить диагностику и тактику ведения больных туберкулезом и саркоидозом легких путем определения роли аутоиммунного воспаления в патогенезе данных заболеваний.

Задачи исследования:

- 1) Изучить особенности формирования иммунных комплексов, индуцированных специфическими антигенами, при туберкулезе и саркоидозе легких.
- 2) Выявить клинические проявления аутоиммунного воспаления при туберкулезе и саркоидозе в структуре аутоиммунного синдрома, индуцированного адъювантами, и определить факторы риска, влияющие на их развитие.
- 3) Провести скрининг аутоантител, принятых в диагностике аутоиммунной патологии, и определить наиболее значимые из них в выявлении аутоиммунного воспаления при туберкулезе и саркоидозе легких.
- 4) Изучить особенности распределения В-клеток при туберкулезе и саркоидозе легких, определить их значимость в алгоритме диагностики аутоиммунного воспаления в сочетании с высоким уровнем аутоантител.

Научная новизна

Впервые доказано, что у больных туберкулезом иммунные комплексы формируются только к специфическим антигенам ESAT6/SFP10, тогда как у больных саркоидозом данные иммунные комплексы определяются после индукции их антигенами стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани», что подтверждает инфекционный и аутоиммунный

характер воспаления и принципиально разный патогенез данных заболеваний; определены наиболее значимые в развитии саркоидоза легких факторы риска, ассоциированные с аутоиммунной патологией (стрессом, наличием аллергических заболеваний в анамнезе и курением), и доказана взаимосвязь между наличием различных триггерных факторов и развитием характерной клинической симптоматики; доказано, что при туберкулезе и саркоидозе легких выявляется высокий уровень ревматоидного фактора и антител к модифицированному цитруллинированному виментину, что характеризует наличие аутоиммунного воспаления и определяет тактику ведения данных пациентов; выявлены различия в субпопуляционном составе В-лимфоцитов при туберкулезе и саркоидозе легких, и доказано, что изменение соотношения «наивных» В-клеток к клеткам памяти 2:1 и повышение уровня В-регуляторных клеток характеризует аутоиммунное воспаление только у больных саркоидозом.

Теоретическая и практическая значимость

Впервые доказано, что определение иммунных комплексов (ИК), образующихся к специфическим антигенам ESAT6/SFP10 и антигенам стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани», характеризует наличие инфекционного и аутоиммунного воспаления, что может быть использовано для диагностики туберкулеза и саркоидоза легких; выявление у больных саркоидозом ряда триггерных факторов (стресса, наследственной предрасположенности к развитию аутоиммунных заболеваний, пирсинга, металлических имплантов, вакцинации за последние 10 лет, а также контакта с металлической пылью) определяет развитие симптомов, характерных для аутоиммунной патологии, и должно сопровождаться их удалением; установлена необходимость определения при туберкулезе и саркоидозе уровня ревматоидного фактора и антител к модифицированному цитруллинированному виментину легких для диагностики аутоиммунного воспаления и назначения патогенетической терапии; доказана возможность диагностики аутоиммунного воспаления при саркоидозе легких с помощью выявления нарушений в распределении субпопуляции В-клеток, а именно высокого уровня регуляторных В - клеток и изменения соотношения «наивных» В - клеток к В-клеткам памяти (2:1) в комплексе с уровнем аутоантител, в отличие от туберкулеза.

Методология и методы диссертационного исследования

С целью решения поставленных задач было проведено проспективное сравнительное исследование по типу «группа-контроль» с набором клинического материала в период с 2017 по 2019 гг. Класс доказательности III, уровень рекомендаций В. В исследование было включено 247 человек, которые были распределены по группам согласно задачам исследования. Всем пациентам был проведен стандартный комплекс обследования, дополненный специальными иммунологическими и физическими методами, необходимыми для решения задач исследования. Исследование проводилось в рамках гранта правительства Российской Федерации (14. W03.31.0009, проект 15.34.3.2017).

Положения, выносимые на защиту

1. При туберкулезе легких формирование иммунных комплексов (ИК) и их изотипов определяется в 100% случаев только к специфическим антигенам ESAT6/SFP10, тогда как при саркоидозе легких данные ИК регистрируются в 100% случаев после индукции их антигенами стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани».
2. Клинические проявления, характерные для аутоиммунной патологии, только у больных саркоидозом легких достоверно часто ассоциированы с триггерными факторами (стрессом в течение 2 ± 1 лет до развития заболевания, наличием аллергических заболеваний и наследственной предрасположенности к развитию аутоиммунных заболеваний, наличием пирсинга, металлических имплантов, проведением вакцинации за последние 10 лет, а также контактом с металлической пылью и работой с принтерами).
3. Из всего спектра наиболее распространенных для диагностики аутоиммунных заболеваний аутоантител у пациентов с туберкулезом и с саркоидозом наиболее значимыми для выявления аутоиммунного воспаления являются ревматоидный фактор и антитела к модифицированному цитруллинированному виментину, определение которых наиболее информативно с применением новых референтных значений.
4. При туберкулезе и саркоидозе легких выявлены достоверные различия

в распределении субпопуляции В-клеток, которые характеризуются повышением относительного числа В-регуляторных клеток памяти (CD5+CD27–) и изменением соотношения «наивных» В-клеток к В-клеткам памяти (2:1) у больных саркоидозом и имеют высокую информативность (91,0%) в алгоритме диагностики аутоиммунного воспаления.

5. Определение уровня специфических иммунных комплексов на этапе постановки диагноза и выявление признаков аутоиммунного воспаления при туберкулезе и саркоидозе легких определяет тактику ведения, лечения и наблюдения больных с данными заболеваниями.

Степень достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и апробация полученных результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается результатами клинико-рентгенологических и лабораторных исследований 247 человек. Методы диагностики и статистический анализ полученных результатов использовались с целью решения поставленной цели и задач исследования. Был научно обоснован и внедрен в клиническую практику новый подход в диагностике аутоиммунных нарушений при туберкулезе и саркоидозе легких, который подразумевает определение специфических иммунных комплексов, индуцированных специфическими антигенами ESAT6/SFP10 и стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани» с помощью метода динамического светорассеяния, поиск характерных для аутоиммунного воспаления симптомов и триггерных факторов, провоцирующих их развитие, а также определение наиболее значимых антител и особенностей распределения субпопуляции В-клеток.

По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 6 - в рецензируемых научных изданиях, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на научно-практических мероприятиях различного уровня, в том числе: X и XI Ежегодных Всероссийских конгрессах по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2018, 2019); VI, VII конгрессах Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2017, 2018); 27-

ом конгрессе Европейского респираторного общества (ERS) (Париж, 2018); Международном конгрессе патофизиологов (Братислава, 2018); Международном конгрессе по аутоиммунитету (Лиссабон, 2018); V-ом международном конгрессе по спорным вопросам в ревматологии и аутоиммунитете (CORA) 2019 (Флоренция, 2019); XXII Международной медико-биологической научной конференции молодых исследователей (2019, СПб); Объединенном иммунологическом форуме (Новосибирск, 2019); научно-практической конференции «Управляемые и другие социально-значимые инфекции: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют области исследования специальности 14.01.16 – фтизиатрия по пункту 1, 2; специальности 14.01.25 – пульмонология по пункту 3,5.

Внедрение результатов исследования в практику. В Федеральную службу по интеллектуальной собственности (Роспатент) подана заявка и получено решение о выдаче патента на изобретение «Способ прогнозирования развития туберкулеза у здоровых лиц» (заявители ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, СПбГУ). Основные положения диссертации внедрены в практику работы отделения дифференциальной диагностики ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, СПб ГБУЗ «Пушкинский противотуберкулезный диспансер», СПб ГБУЗ «Противотуберкулезный диспансер №3», а также в учебный процесс кафедры пульмонологии факультета последипломного образования ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России и учебного отдела ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России.

Личный вклад автора. Автором разработан дизайн исследования, определены цель и задачи работы, проведен анализ отечественной и иностранной литературы, осуществлено обследование, ведение и анализ полученных результатов исследований 247 человек. Представленные в диссертации данные были получены благодаря проведению дополнительного тестирования пациентов с целью выявления наиболее значимых триггерных факторов, а также благодаря включению в комплекс обследования современных иммунологических и физических методов. Автор

самостоятельно проводил сбор и подготовку диагностического материала исследования, участвовал в проведении иммунологических тестов с последующим осуществлением статистического анализа полученных данных.

Объем и структура диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Результаты исследования изложены на 146 страницах, содержат 27 таблиц иллюстрированы 17 рисунками и 3 клиническими примерами. Список литературы включает 69 отечественных и 125 зарубежных источников.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

За период с 2017 по 2019 год было проведено проспективное сравнительное исследование по типу «группа-контроль» с набором клинического материала на базе отделений ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ, СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2», СПб ГБУЗ «Городская противотуберкулезная больница №2» и СПб ГБУЗ «Пушкинский противотуберкулезный диспансер». Исследование одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ВПО «СПбГУ» (выписка из протокола №02-126 от 30.06.2017, дополнения одобрены 20.06.2018), а также Независимым этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (выписка из протокола №34.2 от 19.01.2017). Все пациенты подписали информированное согласие на участие.

В исследование было включено 247 человек, из которых согласно задачам исследования были сформированы следующие группы: I группа (n = 60) - с впервые выявленным туберкулезом легких с бактериовыделением; II группа (n = 114) - больные с установленным диагнозом «саркоидоз легких»; группа контроля - здоровые лица (n = 73), соответствующие критериям включения.

Критериями включения для основных групп были: возраст пациентов от 18 до 65 лет, впервые выявленный бактериологически верифицированный туберкулез легких, впервые выявленный саркоидоз легких (диагноз установлен согласно критериям ATS/ERS/WASOG, 1999). Критериями исключения являлись: прием противотуберкулезной и иммуносупрессивной

терапии, проведение курса плазмафереза, наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, опухолевых заболеваний, декомпенсированного сахарного диабета, аутоиммунной патологии. Контрольная группа была представлена здоровыми добровольцами, которые не имели хронических заболеваний, в том числе онкологических и аутоиммунных, вирусных инфекций, контактов с больными туберкулезом, и у которых были отрицательные результаты пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным.

Всем пациентам проводился стандартный комплекс обследования, который был дополнен специальными методами. С помощью метода динамического светорассеяния (ДСР) в ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» под руководством к.б.н. Филатова М.В. и с участием к.б.н. Ланды С.Б. были определены иммунные комплексы, полученные после добавления *in vitro* антигенов ESAT6/SFP10 и стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани» (заявка на патент № 2015149694). Измерения проводили на лазерном корреляционном спектрометре «ЛКС-03» фирмы «ИНТОКС». Прибор был разработан и создан в отделении молекулярной и радиационной биофизики Петербургского института ядерной физики РАН, а также утвержден комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ для определения размеров микрочастиц в биологических жидкостях (Сертификат RU. С. 39.003. А № 5381). Был использован стандартизированный «экстракт здоровой легочной ткани», который представляет собой экстракт пептидных и иных биологических компонентов, специальным образом подготовленный. Для выявления признаков АСИА-синдрома было проведено анкетирование с применением стандартизированного опросника «Аутоиммунный синдром, индуцированный адьювантами» (ScanziF., 2017, ShoenfeldY., 2011). Уровень различных аутоантител в сыворотке крови пациентов определялся с применением иммуноферментного анализа в лаборатории ФГБОУ «ПСПбГМУ им. ак. И.П. Павлова» под руководством профессора Эмануэля В.Л. и к.б.н. Лапина С.В. Анализ субпопуляционного состава В - лимфоцитов периферической крови был проведен в лаборатории Института экспериментальной медицины под руководством к.б.н. Кудрявцева И.В. с применением метода проточной цитофлуометрии. Полученные в ходе исследования показатели были внесены в базу данных и проанализированы с

использованием пакета прикладных программ Statistica 10.0 с применением методов параметрической и непараметрической статистики. Количественные данные рассчитывались в виде $M \pm m$, где M - среднее арифметическое, m - стандартная ошибка. Оценивали частоту положительных реакций с расчетом 95% доверительного интервала (95% ДИ). Различия или показатели связи считались значимыми при уровне $p \leq 0,05$. Степени ассоциаций между пропорциями оценивались с помощью доверительных интервалов, а также критерия χ^2 с коррекцией Йейтса. Количественные данные при оценке субпопуляционного состава В-клеток (% субпопуляций CD19+) были представлены в виде медианы и квартилей (Med (Q25; Q75)). Для расчета новых референтных значений проводился ROC-анализ. Для расчета диагностической чувствительности (ДЧ), специфичности (ДС) и эффективности (ДЭ) были применены следующие формулы: $a/(a+c)$ (для ДЧ), $d/(b+d)$ (для ДС), $(a+d)/(a+b+c+d)$ (для ДЭ), где a - истинно положительный результат, b - ложноположительный (в случае когда болезнь присутствует - результат положительный); c - ложноотрицательный, d - истинно отрицательный (если болезнь отсутствует - результат отрицательный).

В структуре клинических форм впервые выявленных больных туберкулезом (I группа) преобладал диссеминированный (41,6%) и инфильтративный туберкулез легких (36,7%). Среди пациентов с саркоидозом (II группа) преобладали пациенты с впервые выявленным саркоидозом легких 2-3 стадии подострого течения (85,1%), однако встречались и пациенты с острым началом заболевания по типу синдрома Леффрена (14,9%).

Анализ клинической и рентгенологической симптоматики показал, что у больных туберкулезом легких с бактериовыделением по сравнению с больными саркоидозом достоверно часто определялась респираторная симптоматика (76,7% против 38,6%, $p < 0,001$) и характерные для инфекционного процесса симптомы интоксикации (65,0% против 37,7%, где $p < 0,001$), что сопровождалось изменениями в легочной ткани. В то же время у больных саркоидозом на фоне менее выраженных клинических симптомов достоверно превалировало увеличение внутригрудных лимфатических узлов (82,4% против 28,3%, $p < 0,001$). Новые иммунологические тесты (проба с диаскинтестом и ELISPOT) были положительными у больных туберкулезом

в 87,0% и 88,5% соответственно. Следует отметить, что достоверная разница между положительными и отрицательными результатами тестов у больных саркоидозом была получена только по ELISPOT (9,2% против 90,7%, $p < 0,001$).

Для решения первой задачи исследования было изучено формирование специфических иммунных комплексов (ИК), образующихся после добавления *in vitro* специфических антигенов при туберкулезе и при саркоидозе легких. Уровень иммунных комплексов, индуцированных специфическими антигенами ESAT-6 / SFP-10, представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Определение иммунных комплексов в плазме крови после добавления специфических антигенов ESAT-6/SFP-10 при туберкулезе и саркоидозе

Показатели	Референтные значения (% вклада в светорассеяние)	I группа - туберкулез легких (n = 50)	II группа - саркоидоз легких (n = 28)	Группа контроля (n=24)
	M±SD / n (%)			
Суммарные иммунные комплексы	< 1,0	7,2±2,8 *, ** 50 (100,0)	0,2±0,63 3 (10,7)	0,2±0,8 3 (11,0)
IgG1	< 1,0	4,2±2,0 *, ** 50 (100,0)	0,2±0,6 2 (7,1)	0,1±0,3 1 (3,7)
IgG3	< 1,0	3,2±1,2 *, ** 48 (96,0)	0	0,1±0,3 1 (3,7)
IgE	< 1,0	3,5±1,9 *, ** 46 (92,0)	0,1±0,2 2 (7,1)	0,02±0,1 1 (3,7)
IgG1+IgG3	<1,0	4,1±2,1 *, ** 47 (94,0)	0	0
IgG1+IgE	< 1,0	7,7±4,0 *, ** 13 (26,0)	0	0
IgG3+IgE	< 1,0	7,1±3,6 *, ** 30 (57,0)	0	0

Примечание: * - отличия значимы ($p < 0,001$ для всех показателей) по сравнению с группой II; ** - отличия значимы ($p < 0,001$ для всех показателей) по сравнению с контрольной группой.

Как видно из таблицы 1, формирование специфических ИК к антигенам *M. tuberculosis* (ESAT-6 / SFP-10) достоверно чаще регистрировалось при туберкулезе, чем при саркоидозе (100,0% (I) против 10,7% (II), $p < 0,001$) и в

группе контроля (100,0% (I) против 11,1%, $p < 0,001$). Формирование иммунных комплексов после стимуляции их антигенами ESAT-6 / SFP-10 у пациентов с туберкулезом в 100% случаев свидетельствует о высокой диагностической чувствительности данного метода. При этом определение уровня специфических ИК методом ДСР сопоставимо с положительными результатами ELISPOT у пациентов с саркоидозом (10,7% против 9,2%), что подтверждает достоверность полученных с применением этого метода данных.

У больных саркоидозом (II группа) достоверно чаще по сравнению с больными туберкулезом (I группа) (100,0% против 4,0%, $p < 0,0001$) определялись ИК после индукции их антигенами стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани», что характеризует аутоиммунный характер воспаления у больных саркоидозом и его отсутствие у больных туберкулезом (таблица 2).

Таблица 2 – Определение иммунных комплексов после добавления антигенов стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани» при туберкулезе и саркоидозе легких

Показатели	Референтные значения (% вклада в светорассеяние)	I группа - туберкулез легких (n = 50)	II группа - саркоидоз легких (n = 28)	Группа контроля (n=24)
	M±SD / n (%)			
Суммарные иммунные комплексы	< 1,0	6,1±0,3 1 (4,0)	4,8±0,84 *, ** 28 (100,0)	0
IgG1	< 1,0	2,7 1 (4,0)	3,7±1,0 *, ** 28 (100,0)	0
IgG3	< 1,0	0	2,9±1,0 *, ** 27 (96,4)	0
IgE	< 1,0	0	1,9±0,6 *, ** 26 (92,8)	0
IgG1+IgG3	< 1,0	0	3,5±0,9 *, ** 26 (92,8)	0
IgG1+IgE	< 1,0	0	5,7±1,3 *, ** 25 (89,3)	0
IgG3+IgE	< 1,0	0	5,0±1,2 *, ** 25 (89,3)	0

Примечание: * - отличия значимы ($p < 0,001$ для всех показателей) по сравнению с группой I; ** - отличия значимы ($p < 0,001$ для всех показателей) по сравнению с контрольной группой

Диагностическая эффективность определения специфических ИК с антигенами ESAT-6/SFP-10 для диагностики туберкулеза составляет 92,2%-100% с учетом изотипического состава ИК (ДЧ-94,3; ДС – 87,5%), а при саркоидозе- 100% (ДЧ-100,0%; ДС-100,0%). Включение данного метода в диагностический алгоритм позволит достигнуть максимального уровня диагностики туберкулеза и саркоидоза легких (100%).

Анализ влияния эндогенных и экзогенных факторов в группах показал, что у больных саркоидозом по сравнению со здоровыми лицами достоверно часто в анамнезе встречались следующие АСИА-триггеры: стресс в течение 2 ± 1 лет до развития заболевания ($p < 0,001$), наличие аллергических заболеваний ($p < 0,001$) и наследственная предрасположенность к развитию аутоиммунных заболеваний ($p < 0,01$), наличие пирсинга ($p < 0,001$), металлических имплантов ($p < 0,001$), проведение вакцинации за последние 10 лет ($p < 0,05$), а также контакт с металлической пылью ($p < 0,01$) и работа с принтерами ($p < 0,01$). При этом риск развития именно саркоидоза наиболее высок при воздействии стресса в течение 2 ± 1 лет до развития заболевания ($RR=3,0$), далее – при наличии аллергических заболеваний ($RR=1,22$) и курения ($RR=1,04$). При сравнении больных саркоидозом с больными туберкулезом у пациентов с саркоидозом было выявлено достоверно частое преобладание стресса в течение 2 ± 1 лет до развития заболевания ($p < 0,01$), наличие аллергических заболеваний ($p < 0,01$); остальные факторы в группах достоверно не различались.

При оценке клинических проявлений АСИА-синдрома у больных туберкулезом достоверно часто определялось снижение массы тела ($p < 0,001$), у больных саркоидозом -артралгии ($p < 0,05$). Однако у больных саркоидозом определялась взаимосвязь между ключевыми АСИА-симптомами и наличием АСИА-триггеров, которая выражалась в том, что при наличии триггеров достоверно чаще выявлялись ключевые АСИА-симптомы (88,5% против 50,0%, $p=0,042$).

Проведенный анализ 18 аутоантител, характерных для АСИА - синдрома у больных туберкулезом и саркоидозом легких, показал, что

достоверных различий по уровню антител в данных группах нет. Однако следует отметить, что при туберкулезе чаще, чем при саркоидозе, определялся высокий уровень ревматоидного фактора (21,1% против 14,3%) и несколько чаще - высокий уровень С3 фактора системы комплемента (47,1% против 39,3%). В то же время у больных саркоидозом наиболее значимые результаты были получены по уровню С4 фактора системы комплемента (37,5% против 15,8%), который характеризует наличие общей воспалительной реакции.

Определение уровня антител к модифицированному цитруллинированному виментину (MCV) не входит в комплекс антител АСИА-синдрома, что в совокупности с данными литературы послужило основанием для оценки роли цитруллинации и модификации виментина при туберкулезе и саркоидозе легких. Результаты определения уровня анти-MCV и анти-ССР (cycliccitruinated peptide; антитела к цитрулинированным циклическим пептидам) в сыворотке крови в группах представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты определения анти-MCV и анти-ССР в исследуемых группах

Исследуемые группы пациентов	Данные по анти-MCV		CI 95%	Данные по анти-ССР		CI 95%
	Повышенный уровень п (%)	Абс. значение, Ед/мл (М)		Повышенный уровень п (%)	Абс. значение, Ед/мл (М)	
I группа - туберкулез легких, п (%) n=28	60,7* (17/28)	23,39	19,17-27,61	0 0/17	2,26	0,96-4,55
II группа - саркоидоз легких, п (%) n=93	40,9 (38/93)	20,31	16,97-23,64	2,6 (1/38)	0,89	1,17-2,64
Группа контроля - здоровые лица, п (%) n=40	25,0 (10/40)	14,75	11,52-17,99	0 (0/10)	0,55	0,87-2,10

Примечание: * $p < 0,01$ – достоверные различия между значениями в группе I и в группе контроля

Согласно представленным в таблице 3 данным, у больных с саркоидозом высокий уровень анти-МСV определялся в 40,9% (38/93) случаев, у больных туберкулезом (I группа) он был выявлен в 60,7% (17/28), что достоверно чаще, чем в контрольной группе (25,0%). Уровень антител к ССР был низким, также как на предыдущем этапе исследования. Уровень антител к МСV был определен согласно референтным значениям, принятым для ревматоидного артрита (более 20 Ед/мл). Также был произведен расчет показателей с применением ROC-анализа для пациентов с туберкулезом и саркоидозом, согласно результатам которого значения анти-МСV для данных заболеваний были ниже, чем принято для ревматоидного артрита, и составляли от 14 Ед/мл для туберкулеза и от 10 Ед/мл для саркоидоза.

На следующем этапе проводилась оценка субпопуляционного состава В-лимфоцитов, выделяемых на основании экспрессии на поверхности клеток или молекул IgD и CD38 (таблица 4).

Таблица 4 - Относительное количество субпопуляций В-клеток по «Vm1-Vm5» классификации у пациентов с саркоидозом и контрольной группы

Субпопуляции В-клеток (% от популяции CD19+ клеток)	Фенотип	Группа – саркоидоз легких (n=37) Med (Q25; Q75)	Группа контроля – здоровые лица (n=35) Med (Q25; Q75)	Уровень р
Vm1 - «наивные»	IgD+CD38-	10,10 (7,45; 11,69)	15,44 (12,44; 17,62)	<0,001
Vm2- «активированные наивные»	IgD+CD38+	65,40 (62,13; 72,13)	56,79 (49,89; 67,71)	0,001
Vm2' - клетки-предшественники герминального центра	IgD+CD38++	8,06 (6,14; 11,35)	3,98 (2,68; 6,27)	<0,001
Vm3+Vm4 - центробласты и центроциты	IgD-CD38+++	0,59 (0,28; 0,71)	0,41 (0,28; 0,95)	0,800
eVm5 - клетки ранней памяти	IgD-CD38+	7,25 (5,26; 11,00)	10,65 (7,90; 15,27)	0,005

Vm5 покоящиеся клетки памяти	-	IgD-CD38-	4,83 (2,92; 6,50)	8,36 (5,61; 14,26)	<0,001
------------------------------------	---	-----------	----------------------	-----------------------	--------

Как представлено в таблице 4, относительное число активированных наивных В-клеток Vm2 и Vm2' предшественников клеток зародышевого центра было значительно выше у пациентов с саркоидозом по сравнению со здоровым контролем. В то же время у больных наблюдалось достоверное снижение содержания наивных Vm1 клеток и клеток памяти (eVm5, Vm5) по сравнению с контролем.

На следующем этапе было выделено несколько субпопуляций В-клеток памяти (клетки памяти с непереключенным классом синтезируемых антител («unswitched» IgD+CD27+), клетки памяти с переключенным классом синтезируемых антител («class-switched» memorycells, IgD-CD27+) и, так называемые, «дважды-негативные» клетки памяти (IgD-CD27-)). У больных саркоидозом наблюдался значительно более высокий уровень наивных CD27- В-клеток по сравнению с группой контроля (77,85% (69,87; 84,25) против 62,35% (47,39; 71,42), соответственно, $p < 0,001$, рисунок 1, А). Также было отмечено, что в периферической крови больных было снижено относительное число клеток памяти с фенотипами IgD+CD27+ и IgD-CD27+ ($p < 0,001$ для обеих субпопуляций) (Рис. 1, В и С).

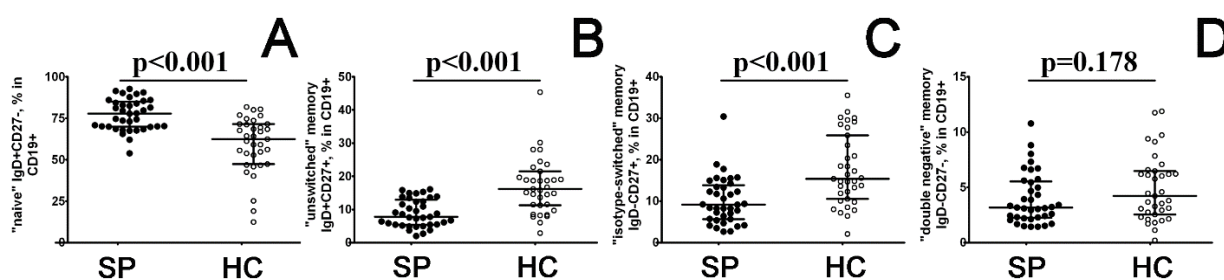


Рисунок 1 - Распределение «наивных», «непереключенных» и «переключенных по изотипу» В-клеток периферической крови у пациентов с саркоидозом легких (SP) в сравнении со здоровым контролем (HC)

Полученные данные свидетельствуют об изменении гомеостаза В-клеток памяти у больных саркоидозом. Было обнаружено, что у больных саркоидозом имеется повышенный уровень В-регуляторных клеток с фенотипом CD24+++CD38++ по сравнению со здоровым контролем (9,82% (CI 95% 7,67- 15,48) и 4,69% (CI 95% 3,10-6,52), соответственно, $p < 0,001$) и с

фенотипом CD5+CD27– по сравнению с группой контроля (17,41% (CI 95% 12,28 - 21,45) и 8,21% (CI 95% 5,55 - 12,01), соответственно, $p < 0,001$). По крайней мере две популяции регуляторных В-клеток, содержащих IL-10-продуцирующие клетки, были значительно увеличены у пациентов с саркоидозом, что характерно для аутоиммунной патологии. Ранее повышение уровня В-регуляторных клеток было описано при таких воспалительных аутоиммунных заболеваниях, как первичный синдром Шегрена и системная красная волчанка.

Для пациентов с саркоидозом в сравнении с больными туберкулезом более характерно повышение уровня «наивных» В-клеток ($p = 0,0155$) и регуляторных CD5+CD27- В-клеток ($p = 0,0010$) и снижение В-клеток памяти ($p = 0,0051$), что является характеристикой аутоиммунного воспаления при саркоидозе. Для саркоидоза диагностически значимым фактором является повышение уровня В-клеток CD5+CD27- более 12,45% (диагностическая чувствительность – 91,0%, диагностическая специфичность – 88,0%) и изменение соотношения «наивных» В-клеток к клеткам памяти более 2:1, что характеризует аутоиммунный характер воспаления. При туберкулезе легких наблюдается незначительное увеличение «наивных» В-клеток и уменьшение В-клеток памяти.

Проведенное исследование позволило разработать алгоритм диагностики туберкулеза и аутоиммунного воспаления у больных туберкулезом и саркоидозом легких с применением наиболее информативных методов, представленный на рисунке 2.



Рисунок 2 - Алгоритм диагностики аутоиммунного воспаления при туберкулезе и саркоидозе легких и тактики ведения пациентов

Согласно предложенному алгоритму, специфический инфекционный характер воспаления у пациентов с рентгенологическими изменениями в легких и/или внутригрудных лимфатических узлах может быть подтвержден при формировании специфических ИК, индуцированных антигенами ESAT6/SFP10, а аутоиммунный характер воспаления характеризует формирование ИК с антигенами стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани». Аутоиммунный компонент у пациентов с туберкулезом диагностируется при выявлении повышенного уровня аутоантител к МСВ от 14 Ед/мл и/или ревматоидного фактора. Выраженность аутоиммунного воспаления при саркоидозе легких подтверждается высоким уровнем указанных аутоантител и изменением субпопуляционного состава В-клеток периферической крови. Выявление наиболее значимых АСИА-триггеров свидетельствует о риске развития характерной для аутоиммунной патологии симптоматики. Выявление аутоиммунного воспаления при туберкулезе и саркоидозе может служить показанием для рассмотрения вопроса о назначении патогенетической терапии с целью улучшения результатов лечения заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Определение специфических иммунных комплексов к антигенам ESAT-6/SFP-10 и к антигенам стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани» является высокоэффективным способом диагностики инфекционного и аутоиммунного воспаления, результаты которого имеют принципиальное значение в выборе тактики ведения пациентов с туберкулезом и саркоидозом легких.
2. Выявление у больных саркоидозом наиболее значимых триггерных факторов (стресса, наследственной предрасположенности к развитию аутоиммунных заболеваний, наличия пирсинга, металлических имплантов, проведения вакцинации за последние 10 лет, а также контакта с металлической пылью) определяет развитие характерной для аутоиммунного воспаления симптоматики, что требует выявления данных триггеров и при возможности элиминации.
3. Повышение уровня ревматоидного фактора и антител к модифицированному цитруллинированному виментину как при туберкулезе, так и при саркоидозе легких свидетельствует об аутоиммунном воспалении и является показанием для назначения патогенетической терапии.
4. Изменение соотношения числа «наивных» В-клеток к В-клеткам памяти более 2:1 и выявление высокого уровня В-регуляторных клеток при саркоидозе с диагностической чувствительностью 91,0%, свидетельствует о наличии аутоиммунного воспаления и может быть использовано в комплексе с определением уровня антител при саркоидозе, но не при туберкулезе.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение специфических иммунных комплексов к антигенам ESAT-6/SFP-10 и к антигенам стандартизированного «экстракта здоровой легочной ткани» необходимо использовать для диагностики инфекционного и аутоиммунного воспаления у больных с подозрением на туберкулез и саркоидоз легких.
2. У больных саркоидозом необходимо выявление наиболее значимых триггерных факторов (стресса в течение 2 ± 1 лет до развития заболевания, аллергических заболеваний, пирсинга, наличия металлических имплантов, проведения вакцинации за последние 10 лет, контактов с металлической

пылью и работы с принтерами) для определения тактики ведения и прогноза течения заболевания.

3. Диагностику аутоиммунного воспаления при туберкулезе легких следует проводить с определением уровня ревматоидного фактора (RF) и антител к модифицированному цитрулинированному виментину (MCV) с применением новых референтных значений (от 14 Ед/мл), тогда как при саркоидозе легких следует определять не только уровень RF и антител к MCV (от 10 Ед/мл), но и соотношение числа «наивных» В-клеток к В-клеткам памяти более 2:1 и уровень В-регуляторных клеток.

4. Выявление аутоиммунного воспаления у больных туберкулезом и саркоидозом легких требует изменения подхода к тактике ведения пациентов и рассмотрения возможности назначения патогенетической терапии для улучшения результатов лечения и прогноза течения заболеваний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные данные являются первым этапом в формировании нового подхода к определению тактики ведения больных с аутоиммунным воспалением при туберкулезе и саркоидозе легких. Продолжением данного направления может служить разработка новых диагностических тестов, основанных на определении уровня специфических иммуноглобулинов, внедрение новых лечебных технологий при туберкулезе и саркоидозе легких. Остается неизученной роль аутоиммунного воспаления в развитии и течении генерализованных форм данных заболеваний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

1. Генерализованный саркоидоз с вовлечением сосудов и ANCA-ассоциированный васкулит как нозология: к вопросу дифференциальной диагностики (описание клинического случая) / **Ю.С. Зинченко**, Б.М. Ариэль, Т.А. Степаненко, В.А. Волчков // Медицинский альянс. – 2017. - № 3. - С. 77-83.

2. Проблема дифференциальной диагностики туберкулеза и саркоидоза органов дыхания (обзор литературы) / М.А. Белокуров, Н.Ю. Басанцова, **Ю.С. Зинченко**, А.А. Старшинова // Медицинский альянс. - 2018. - №3. - С. 16-24.
3. Диагностическое значение специфических иммунных комплексов в определении активности туберкулезной инфекции / А.А. Старшинова, Е.В. Истомина, **Ю.С. Зинченко**, М.В. Филатов, В.С. Бурдаков, Е.Н. Беляева, М.М. Назаренко, С.Б. Ланда, Н.В. Сапожникова, М.В. Павлова, П.К. Яблонский // Медицинская иммунология. – 2019. – №2. – С. 269-278.
4. Аутоиммунная природа саркоидоза: определение специфических иммунных комплексов у больных саркоидозом органов дыхания / **Ю.С. Зинченко**, А.А. Старшинова, М.В. Филатов, Е.В. Истомина, В.С. Бурдаков, Н.В. Денисова, С.Б. Ланда, В.С. Бурдаков, Т.А. Степаненко, П.К. Яблонский // Медицинская иммунология – 2019. – №3. – С. 479-486.
5. Эффективность применения новых методов иммунодиагностики туберкулезной инфекции в Российской Федерации (обзор литературы) / А.А. Старшинова, Д.А. Кудлай, И.Ф. Довгалюк, Н.Ю. Басанцова, **Ю.С. Зинченко**, П.К. Яблонский // Педиатрия. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2019.- №4. – С. 274-279.
6. Нарушения в субпопуляционном составе Т-хелперов¹⁷ и фолликулярных Т-хелперов у больных туберкулезом легких / И.В. Кудрявцев, М.К. Серебрякова, А.А. Старшинова, **Ю.С. Зинченко**, Н.Ю. Басанцова, Е.Н. Беляева, М.В. Павлова, П.К. Яблонский // Инфекция и иммунитет. – 2019. - Т. 9, № 2. - С. 304–314.

Патенты на изобретение

7. Способ прогнозирования развития туберкулеза у здоровых лиц: заявка Рос. Федерация: МПК G01N 33/49, G01N 33/53 (2006/01) / Старшинова А.А., Зинченко Ю.С., Истомина Е.В., Филатов М.В., Денисова Н.В., Павлова М.В., Сапожникова Н.В., Яблонский П.К., Бурдаков В.С., Чурилов Л.П.; заявители ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России, СПбГУ. - №2018136193; заявл. 12.10.2018. – Решение о выдаче патента 30.09.2019.

Работы, опубликованные в других изданиях

8. Specific Features of immune forming complexes in patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis / A. Starshinova, **Yu. Zinchenko**, M. Filatov, N. Denisova, E. Istomina, S. Landa, V. Burdakov, L. Churilov, N. Sapozhnikova, M. M. Pavlova, T. Stepanenko, V. Mayevskaya, P. Yablonskiy // Immunologic Research. – 2018. – Vol.7, №1. – P.1-7.

9. Туберкулез сегодня: основные направления исследований по профилактике, диагностике и лечению / **Ю.С. Зинченко**, Н.Ю. Басанцова, А.А. Старшинова, Г.Б. Умутбаева // Российские биомедицинские исследования. – 2018. – Т.3, №4. – С.25-36.
10. Detection of small fiber neuropathy in patients with pulmonary sarcoidosis / N.Yu. Basantsova, **Ju.S. Zinchenko**, A.A. Starshinova, P.K. Yablonskiy // Pathophysiology. – 2018. - Vol. 25, Issue. 3. - P. 240-241.
11. Evaluation of specific immune complexes in patients with pulmonary sarcoidosis / **U. Zinchenko**, A. Starshinova, M. Filatov, V. Burdakov, S. Landa, N. Denisova, P. Yablonskiy // Eur. Respir. J. – 2018. – Vol.52, suppl.62. – PA3011.
12. Autoreactivity in patients with respiratory sarcoidosis / **U. Zinchenko**, A. Starshinova, N. Denisova, S. Lapin, A. Mazing, E. Surkova, P. Yablonskiy // Eur. Respir. J. – 2018. – Vol.52, suppl.62. – PA5212.
13. Immunological differences between lung tuberculosis and latent tuberculosis infection // A. Starshinova, E. Istomina, **U. Zinchenko**, N. Denisova, M. Nazarenko, V. Burdakov, S. Landa, M. Filatov, P. Yablonskiy // Eur. Respir. J. – 2018. – Vol.52, suppl.62. – PA4736.
14. The study of environmental exposures as a part of the ASIA syndrome in the development of sarcoidosis / **Yu.S. Zinchenko**, N.V. Denisova, G.A. Ershov, I.A. Zaitsev, T.A. Stepanenko, A.A. Starshinova, P.K. Yablonskiy // 11th International Congress on Autoimmunity. – Lisbon, 2018. – Auto1- 0564.
15. Evaluation of specific immune complexes in patients with sarcoidosis and respiratory tuberculosis / A.A. Starshinova, M.V. Filatov, V.S. Burdakov, S.B. Landa, **Yu.S. Zinchenko**, N.V. Denisova, T.A. Stepanenko, P.K. Yablonskiy // 11th International Congress on Autoimmunity. – Lisbon, 2018. - Auto1-0320.
16. A Comparison of Intradermal Test with Recombinant Tuberculosis Allergen (Diaskintest) with Other Immunologic Tests in the Diagnosis of Tuberculosis Infection / A. Starshinova, V. Zhuravlev, I. Dovgaluk , A. Panteleev, V. Manina, **U. Zinchenko**, E. Istomina, M. Pavlova, P. Yablonskiy // International Journal of Mycobacteriology. – 2018. – Vol.7, №1. - P. 32–39.