© Коллектив авторов, 2019

УДК 616.24-002.5-036.3

**Характеристика аутоиммунного воспаления у больных туберкулезом легких**

Старшинова А.А.2 Малкова А.2, 3, Зинченко Ю.С.1,3, Басанцова Н.Ю.1,2, Павлова М.В.1, Беляева Е.Н.,5 Лапин С.В.3, Мазинг А.3, Суркова Е.3, Яблонский П.К.1,2

ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург 1

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург2

Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург (Российская Федерация)3

Санкт-Петербургское ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2», Санкт-Петербург4

СПб ГБУЗ «Туберкулезная больница №2», Санкт-Петербург 5

**Контактная информация:** Старшинова Анна Андреевна – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории мозаики Санкт-Петербургского государственного Университета, 199034, Университетская наб., д. 7–9, Cанкт-Петербург, Россия;, e-mail: starshinova\_777@mail.ru

**Резюме**

Туберкулез лёгких является одним из гранулематозных заболеваний, которые могут иметь аутоиммунные нарушения. Высокий уровень аутоантител к различным модификациям виментина в плазме крови пациентов с данной патологией может являться одним из доказательств аутоиммунной патологии.

**Материалы и методы.** Исследование проводилось за период 2014-2017 гг. с включением 28 больных туберкулезом легких (группа I), 30 больных с аутоиммунными неспецифическими заболеваниями легких (II группа), 15 с гранулематозным полиангиитом и 15 с аллергическими альвеолитами. Контрольную группу составили здоровые субъекты (n = 40). Концентрация антител к модифицированному цитруллинированному виментину (анти-MCV) была измерена в сыворотке крови всех участников исследования. Пациенты с повышенным уровнем анти-MCV были протестированы на наличие антител к циклическому цитруллинированному пептиду (анти-CCP) и цитруллинированному виментину (анти-Sa). Статистический анализ был проведен с использованием GraphPad Prism 6 (Graph Pad Software, США), Statistica 10 (Statsoft, США). Различия считались статистически значимыми при уровне p менее 0,05.

**Результаты исследования.** Концентрации анти-MCV антител были значительно выше у пациентов с туберкулезом (группа I, 60,7% случаев, 17/28) по сравнению с группы III и IV (23,6% и 25,0% случаев соответственно). Статистически значимой разницы между результатами уровня анти-MVC и анти-CCP в группах сравнения с контрольной группой обнаружено не было (р = 0,18).

**Заключение.** Высокий уровень анти-MCV антител у пациентов туберкулезом легких отражает возможность развития аутоиммунного процесса в патогенезе заболеваниz. Измерение концентрации в плазме крови анти-MCV антител может иметь значение для коррекции назначаемой терапии, в особенности при назначении иммуносупрессивных и гормональных лекарственных средств.

**Ключевые слова:** туберкулез, виментин, модифицированный цитруллинированный виментин, аутоантитела

**Abstract**

**Keywords**

**Введение**

Туберкулез (ТБ), является одним из гранулематозных заболеваний с известным этиологическим фактором. Связь туберкулеза легких с возможным развитием аутоиммунного процесса остается малоизученным вопросом [1, 3].

В 1986 году Y. Shoenfeld высказал предположение, что среди всех триггерных факторов, приводящих к развитию аутоиммунных реакций, именно инфекционные факторы и непосредственно *M. tuberculosis*, заслуживают наибольшего внимания, однако научных работ, посвященных клиническому и лабораторному изучению данного вопроса, по-прежнему недостаточно [15, 6]. В настоящее время имеются данные о возможной провоцирующей роли *M. tuberculosis* в развитии таких заболеваний, как саркоидоз, системная красная волчанка, ревматоидный артрит, первичный билиарный цирроз печени и многие другие [5, 13, 16].

 Одним из возможных механизмов развития аутоиммунной реакции на фоне туберкулезной инфекции является молекулярная мимикрия. Важная роль отводится белкам теплового шока (БТШ, heat-shock protein, HSP), в норме активирующимся при повышении температуры и других стрессовых воздействиях на клеточном уровне. БТШ существенно различаются у человека и микроорганизмов, что обеспечивает возможность возникновения перекрестной реактивности. Показано, что такие подтипы БТШ как HSP65 и HSP70 могут влиять на дифференцировку T-хелперов 1 и 2 типа, способствуя экспрессии ко-стимулирующих молекул и молекул адгезии. Также нельзя исключить, что, при персистировании *M. tuberculosis* в организме человека, происходит значительное высвобождение провоспалительных цитокинов и более выраженная активация аутореактивных Т-клеток [3, 8].

 При туберкулезе нередко наблюдают у своих пациентов различные клинические симптомы, характерные для системных заболеваний [10]. К наиболее ярким примерам можно отнести ревматоид Понсе, реактивный неспецифический артрит, возникающий на фоне туберкулезной инфекции, при котором *M. tuberculosis* не выявляется непосредственно в ткани суставов. Чаще всего для пациентов, страдающих ТБ, характерен моноартрит, однако в редких случаях также регистрируются различные формы полиартрита. Помимо этого, у пациентов с активным туберкулезным процессом может выявляться увеит и нодозная эритема, также являющиеся характерными признаками системных заболеваний [6, 8].

Клинические наблюдения подтверждаются при проведении лабораторной диагностики. Аутоантитела, характерные для гранулематоза с полиангиитом и системной красной волчанки, в ряде исследований встречались у 40% пациентов с ТБ [5]. В некоторых исследованиях указывают на статистически значимое повышение концентраций в плазме крови антител к двуцепочечной ДНК (32% обследованных пациентов), антинуклеарных антител (38%), антител к рибонуклеопротеинам (15%), анти-SSA (64%) и анти-ACA-IgM антител (59%) у больных туберкулезом [7, 9]. В редких случаях регистрируются антитела к цитоплазме нейтрофилов (ANCA), антитела к бета-2-гликопротеиду (anti-b2 GPI) и антикардиолипиновые антитела, однако результаты научных работ, связанные с ними, противоречивы и требуют дальнейших исследований [6, 8].

В последние несколько лет внимание исследователей привлекал аутоантиген виментин, филаментный белок мезенхимальных клеток. Группа Кристиана Эберхардта в 2017 году продемонстрировала повышение выработки интерферона гамма (IFN-γ) и фактора некроза опухолей альфа (TNF-α) моноцитами после инкубации с виментином, а также с реагентом Квейма (обработанной тканью селезенки, пораженной саркоидными гранулемами) [11], что связано с генотипом HLA-DRB1 \* 03 и предрасположенностью к выработке повышенного уровня антител к виментину [2].

Виментин - пептид, который присутствует в клетках соединительной ткани и участвует в межклеточных взаимодействиях и функционировании иммунной системы [4]. Возникновение аутоантител к данному белку описано в патогенезе ревматоидного артрита, системной красной волчанки и многих других заболеваний соединительной ткани [16].

В 2007 году группа Wahlström описала возможные аутоантигены, связанные с молекулами HLA-DR в клетках бронхоальвеолярной жидкости у пациентов с саркоидозом [15]. Также был продемонстрирован выраженный ответ Т-клеток бронхоальвеолярной жидкости на виментин и цитрулинированного виментина у пациентов с генотипом HLA DR-B1\*0301 и остро протекающим заболеванием [2].

В современной литературе недостаточно данных об аутоиммунных нарушениях у больных туберкулезом, что послужило причиной данного исследования - определение уровня аутоантител к различным модификациям виментина у пациентов с туберкулезом легких и с другими неспецифическими гранулематозными заболеваниями легких.

**Материалы исследования.**

Ретроспективно-проспективное сравнительное исследование было проведено за период с 2014 по 2017 года с набором пациентов на базе ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава РФ и СПб ГБУЗ «Городская многопрофильная больница №2». Лабораторная часть исследования проводилась в Лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний СПб ГМУ им. И.П. Павлова.

Исследование одобрено независимым этическим комитетом ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России (выписка из протокола №34.2 от 19.01.2017) и Локальным Этическим Комитетом Санкт-Петербургского Государственного Университета (протокол № 01-126 30.06.17). Все участники исследования подписали информированное согласие на обработку индивидуальных данных.

Согласно дизайну исследования, было включено 28 пациентов с бактериологически верифицированным туберкулезом легких (I группа), 30 больных с аутоиммунными неспецифическими заболеваниями легких (II группа) (15 с гранулематозным полиангиитом и 15 с аллергическими альвеолитами). Контрольную группу составили здоровые субъекты (n = 40). (гранулематозным полиангиитом (n=15) и альвеолитами (n=15)). Контрольная группа была представлена здоровыми добровольцами (n=40), которые не имели хронических заболеваний, в том числе, онкологических, контактов с больными туберкулезом; отмечалось отсутствие изменений по лабораторным показателям.

Группы были сопоставимы по полу и возрасту. Критериями исключения являлись: срок более 2 лет с выявления рентгенологических изменений в легких, прием иммуносупрессивной и противотуберкулезной терапии, проведение курса плазмафереза сроком менее 2 месяцев с момента включения, наличие ВИЧ-инфекции, сифилиса, опухолевых заболеваний, декомпенсированного сахарного диабета.

**Методы исследования**

Все пациенты прошли комплекс обследования, включавший клиническую оценку заболевания, мультиспиральную компьютерную томографию (МСКТ) органов грудной клетки, лабораторные исследования крови, стандартный комплекс обследования на туберкулез, гистологическую верификацию изменений в легких и внутригрудных лимфатических узлах по показаниям (с применением чрезбронхиальной и видеоторакоскопической биопсии).

Диагноз «туберкулез легких» верифицировался на основании характерных рентгенологических изменений (лимфаденопатии средостения, очаговых и инфильтративных изменений с деструкцией или без нее); положительных результатов обследования на туберкулез (выявление в анализах мокроты *M.tuberculosis* (MBT) и / или MTB ДНК по данным молекулярно-генетических и бактериологических методов) [1].

 В сыворотке всех включенных в исследование участников был определен уровень антител к модифицированному цитрулинированному виментину (modified citrullinated Vimentin, anti-MCV). Сыворотка пациентов с повышенным уровнем anti-MCV была исследована на антитела к циклическому цитрулинированному пептиду (cyclic citrullinated peptide, anti-CCP) и цитрулинированному виментину (citrullinated Vimentin, anti-Sa). Антитела к anti-MCV определялись с применением ELISA (ORGENTEC, Germany), к anti-CCP и anti-Sa - с применением ELISA (EUROIMMUN, Germany). Все измерения были выполнены с помощью планшетного ИФА спектрофотометра BIO-TEK ELx800. Положительным результатом является обнаружение уровня указанных антител более 19,5 Ед/мл.

**Статистические методы**

Статистический анализ полученных данных проводился с использованием GraphPad Prism 6 с использованием теста Манна-Уитни для непараметрических выборок, при значениях переменных меньше 5 применяли точный тест Фишера. Количественные данные рассчитывались в виде М±SD. Степени ассоциаций между пропорциями оценивались с помощью доверительных интервалов, а также критерия χ2 с коррекцией Йейтса. Для определения взаимосвязи между признаками был использован корреляционный анализ Спирмана. Различия или показатели связи считались статистически значимыми при уровне р менее 0.05.

Работа поддержана грантом Правительства РФ (договор № 14.W03.31.0009 от 13.02. 2017 г.) о выделении гранта для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых.

**Результаты исследования.**

Результаты определения уровня anti-MCV и anti-CCP в сыворотке крови представлены в таблице 1.

Согласно представленным в таблице 1 данным, у больных у больных туберкулезом (I группа) был диагностирован в 60,7% (17/28), что достоверно чаще, чем в группе контроля (25.0%).

Далее нами был проведен анализ anti-CCP, результаты которого представлен в таблице 2.

У больных туберкулезом высокого уровня anti-CCP не было выявлено ни у одного пациента. В группе больных с неспецифическими заболеваниях легких (n=9) был изучен уровень Anti-Sa (Таблица 2).

У 13 больных с саркоидозом органов дыхания и с положительным уровнем anti-MCV была обнаружена умеренная прямая связь между титрами anti-MCV и anti-Sa (r = 0.66), что отражено на рисунке 1.

Согласно результатам статистического анализа, распределение уровня anti-MVC и anti-CCP в I и II группах была выявлена статистически значима в сравнении с группой контроля (p=0.03 для I группы и p=0.0002 для II группы) и между I и II группами (p=0.02). Статистически значимой разницы между результатами уровня anti-MVC и anti-CCP в группах сравнения с контрольной группой (p=0.18) выявлено не было.

Результаты сравнения уровня anti-MCV у пациентов с саркоидозом, туберкулезом представлены на рисунке 2.

Согласно представленным на рисунке 2 данным, статистически достоверные различия была получены при сравнении I и II группы пациентов (p=0.0002).

В таблице №3 приведены результаты расчета чувствительности и специфичности определения anti-MCV в исследуемых группах.

Было произведено сравнение клинической картины у больных саркоидозом с повышенным уровнем anti-MCV (38/93 – 40.93%) и с нормальным уровнем anti-MCV (55/93 – 59.1%). Среди пациентов с повышенным уровнем anti-MCV достоверно чаще встречались пациенты с острым течением саркоидоза по типу синдрома Лефгрена (10/38 (27.7%) против 2/55 (3.6%), p=0.002). При сравнении среднего количества неспецифических симптомов, характерных для аутоиммунной патологии (суставной синдром, сухость слизистых, нарушения сна, нарушения памяти, повышение температуры тела, общая слабость, усталость и т.п.) у больных саркоидозом с повышенным уровнем anti-MCV было отмечено достоверно большее количество подобных проявлений (5.4 против 1.3 симптомов (p=0.03).

**Результаты и их обсуждение.**

Согласно полученным в исследовании данным, получены статистически значимые результаты по высоким показателям уровня антител к анти-MCV у больных с саркоидозом и туберкулезом по сравнению с контрольной группой (р=0.03 и 0.0002 соответственно), что характерно для аутоиммунных процессов (28-30). В тоже время не было выявлено повышения концентрации анти-CCP антител.

Вероятно, причиной появления аутоантител может является молекулярная мимикрия, которая описана при хронической инфекции на фоне гиперреактивного иммунного ответа. Согласно литературным данным возможным аутоантигеном является виментин [6, 8], что было выявлено в нашем исследовании. В качестве микобактериальных антигенов, участвующих в перекрестной реакции, могут быть белки теплового шока Mtb-HsP60, Mtb-HsP65, каталаза (mKatG) [13].

Наличие антител у больных туберкулезом и саркоидозом легких может отражать связь между патогенезом данных заболеваний с возможностью перекрестной реактивности иммунной системы против виментина и пептидов *M.tuberculosis*, что отмечалось во многих исследованиях по изучению роли микобактериальных антигенов при саркоидозе и возможной роли *M.tuberculosis* в качестве триггерного фактора [5, 12, 13].

Полученные данные позволяют предположить, что цитруллинирование и модификация виментина не играют важной роли в формировании иммунного ответа против этого белка, что также не может служить значимым диагностическим критерием. Также не имеет существенного значения определение уровня самого виментина. Однако выявление аутоиммунного компонента является значимым для ведения больных с туберкулезом и саркоидозом для коррекции лечения и назначения гормональной терапии.

**Заключение**

В данном исследовании впервые были получены данные о концентрации в плазме крови аутоантител к виментину у пациентов с саркоидозом и туберкулезом легких.

Антитела к модифицированному цитруллинированному виментину были обнаружены во всех исследованных группах, но для саркоидоза и туберкулеза этот маркер имел большее значение, чем для других заболеваний легких. При этом, высокая концентрация виментина в плазме крови и выявление анти-MCV антител не может служить диагностическим критерием для данных заболеваний, так как они связаны с фундаментальными аспектами патогенеза данных заболеваний. Однако наличие аутоиммунного компонента является значимым для коррекции терапии данных пациентов и повышение уровня анти-MCV антител может служить маркером для назначения иммуносупрессивной и гормональной терапии.

Впервые было показано, что антитела к цитруллинированным циклическим пептидам не значимы в патогенезе саркоидоза, туберкулеза и других исследуемых заболеваний легких (ХОБЛ, гранулематоз с полиангиитом, альвеолиты). Отсутствие анти-CCP и положительная корреляция выявления анти-MCV и анти-Sa позволяют предположить, что цитруллинирование и модификация виментина не является ключевым фактором в формировании аутоиммунного ответа к данному пептиду.

**Список литературы.**

1. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / под ред. П. К. Яблонского. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. — 240 с.
2. Arango M, Perricone C, Kivity S, Cipriano E, Ceccarelli F, Valesini G, Shoenfeld Y. HLA-DRB1 the notorious gene in the mosaic of autoimmunity. Immunol Res. 2017; 65(1):82-98.
3. Ang SC, Moscovic EA. Cross-reactive and species specific Mycobacterium tuberculosis antigens in the immunoprofile of Schaumann bodies: a major clue to the etiology of sarcoidosis. Histol Histopathol. 1996; 11(1): 125-34.
4. Cain H, Kraus B. Immunofluorescence microscopic demonstration of vimentin filaments in asteroid bodies of sarcoidosis. A comparison with electron microscopic findings. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1983; 42(2): 213-26.
5. Chen ES, Wahlström J, Song Z, Willett MH, Wikén M, Yung RC, West EE, McDyer JF, Zhang Y, Eklund A, Grunewald J, Moller DR. T Cell Responses to Mycobacterial Catalase-Peroxidase Profile a Pathogenic Antigen in Systemic Sarcoidosis1 J Immunol. 2008; 181(12): 8784–8796.
6. Elkington P, Tebruegge M, Mansour S. Tuberculosis: an Infection-Initiated Autoimmune Disease? Trends Immunol. 2016; 37(12): 815–818.
7. [Elkayam O](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Elkayam%20O%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17352097), [Caspi D](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Caspi%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17352097), [Lidgi M](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lidgi%20M%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17352097), [Segal R](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Segal%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=17352097). Auto-antibody profiles in patients with active pulmonary tuberculosis. [Int J Tuberc Lung Dis.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17352097) 2007 Mar;11(3):306-10.
8. Ribeiro FM, Goldenberg T. Mycobacteria and autoimmunity. Lupus. 2015; 24: 374–381.
9. Mariya V, Samsonova A, Chernyaev L. Granulomatous lung diseases Pulmonology. 2017; 27 (2): 250–261.
10. Fagan EA, Moore-Gillon JC, Turner-Warwick M. Multiorgan granulomas and mitochondrial antibodies. J Med 1983; 308:572-75
11. Musaelyan A, Lapin S, Nazarov V, Tkachenko O, Gilburd B, Mazing A, Mikhailova L, Shoenfeld Y. Vimentin as antigenic target in autoimmunity: a comprehensive review. Autoimmun Rev. 2018;17(9):926-934.
12. Scadding JG. Mycobacterium tuberculosis in the aetiology of sarcoidosis. BMJ 1960; 2:1617–1623
13. Sester M, Kampmann B. What defines latent infection with Mycobacterium tuberculosis in patients with autoimmune diseases? Thorax. 2016; Vol 71: 64-72.
14. Shapira Y, Agmon-Levin N, Shoenfeld Y. Mycobacterium Tuberculosis, Autoimmunity, and Vitamin DClinic Rev Allerg Immunol (2010) 38:169–177
15. Shoenfeld Y, Vilner Y, Coates ARM, Rauch J, Lavie G, Shaul D, Pinkhas J. Monoclonal anti-tuberculosis antibodies react with DNA, and monoclonal anti-DNA autoantibodies react with Mycobacterium tuberculosis. Clin. exp. Immunol. (1986) 66, 255-261
16. Valesini G, Gerardi MC, Iannuccelli C, Pacucci VA, Pendolino M, Shoenfeld Y. Review Citrullination and autoimmunity. Autoimmun Rev. 2015;14(6): 490-7.

Таблица 1. Результаты определения анти-MCV в исследуемых группах

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  Исследуемые группы пациентов | Данные по аnti-MCV  | Cl 95% | Данные по аnti-CCP  | Cl 95% |
| Повышенный уровеньn/% | Абсолютное значение(M±m) | Повышенный уровень n/% | Абсолютное значение(M±m) |
| I группа (туберкулез), n=28 | 60,7\* (17/28) | 23,39±10,65 | 19.17-27,61 | 00/17 | 2,26±1,36 | 0,96-4,55 |
| II группа (аутоиммунные неспецифические заболевания легких), n=30 | 23,6 (13/55) | 33,94±31,47 | 10,53-19,12 | 15,42/13 | 2,43±1,45 | 0,69-9,76 |
| Здоровые лица (группа контроля), n=40 | 25,0(10/40) | 14,75±12,47 | 11,52-17,99 | 0(0/10) | 0,55±0,37 | 0,87-2,10 |

\*р<0,01 – достоверные различия между значениями в группе II и III и IV группах

Таблица 2. Уровень anti-Sa у больных туберкулезом и в группах сравнения

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  Исследуемые группы пациентов | Число пациентов с повышенным уровнем Anti-Sa(n, %) | Абсолютные значение(M±m) |
| I группа (туберкулез), n=28 | 0/280 | 2,26±15.34 |
| II группа (аутоиммунные неспецифические заболевания легких), n=30 | 8/ 3026,7 | 2,48±50.59 |
| Здоровые лица (группа контроля), n=40 | 0/150 | 2.68±16.34 |



Рисунок 2. Уровень Anti-MCV в исследуемых группах

\*- p<0.01 – достоверные различия при сравнении результатов I и II групп

\*\*\* - p<0.0001 - достоверные различия при сравнении результатов II, III группы и группы контроля

\*\*\*\* - p<0.0001 - достоверные различия при сравнении результатов II и III групп