

МОРФОТИПЫ МИКОБАКТЕРИЙ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПЛАЗМЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ АКТИВНЫМ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

В.М.Кагола

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,
675000, г. Благовещенск, пер. Речной, 1

РЕЗЮМЕ

Цель – исследовать плазму крови больных различными формами активного туберкулеза легких с помощью сканирующей электронной микроскопии. Объект исследования – 26 пациентов обоего пола в возрасте от 27 до 70 лет в том числе 2 больных очаговым туберкулезом в фазе инфильтрации, 11 – инфильтративным туберкулезом в фазе распада и обсеменения, 2 – диссеминированным туберкулезом в фазе распада, 8 – фиброзно-кавернозным туберкулезом в фазе инфильтрации и обсеменения, у 3 пациентов диагностирована туберкулема. В мокроте 13 больных обнаружены микобактерии туберкулеза. Повторно (в процессе лечения) плазма крови исследована у 17 (65%) лиц. С помощью сканирующей электронной микроскопии у пациентов с активным туберкулезом легких обнаружена бактериемия в виде элементарных телес L-форм бактерий, их агрегатов, дочерних особей, палочковидных клеток (микобактерий), сходных с *M. Tuberculosis*, а при прогрессировании туберкулеза – нитевидных структур. Количественно-качественные характеристики обнаруженных в плазме крови морфотипов сопряжены с формой, фазой, распространенностью туберкулезного процесса и степенью интоксикации, потому данные морфотипы рассматриваются как микобактерии. Сканирующая электронная микроскопия плазмы крови позволяет контролировать эффективность химиотерапии туберкулеза, достоверность прекращения бактериовыделения, прогнозировать рецидивы и пр.

Ключевые слова: туберкулез, L-трансформанты в плазме крови, сканирующая электронная микроскопия.

SUMMARY

MORPHOLOGICAL TYPES OF MYCOBACTERIA CIRCULATING IN BLOOD PLASMA OF PATIENTS WITH ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS

V.M.Katola

Institute of Geology and Nature Management of Far
Eastern Branch RAS, 1 Relochny Lane,
Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

The aim of the research is to study the blood plasma of patients with different forms of active pulmonary tuberculosis with the help of scanning electronic microscopy. The object of the study is 26 patients of both sexes aged from 27 till 70 years including 2 patients with local tuberculosis in the phase of infiltration, 11 patients with infiltrative tuberculosis in the dissolution

and semination phase, 8 with fibrous-cavernous tuberculosis in the infiltration and semination phase, and 3 patients with a diagnosed tuberculoma. In the sputum of 13 patients tuberculosis mycobacteria were found. Repeatedly (during the treatment) blood plasma was studied in 17 (65%) patients. With the help of scanning electronic microscopy the patients with active pulmonary tuberculosis were found to have bacteriemia in the form of elementary bodies L-form bacteria, their aggregates, daughter cells, rod-like cells (mycobacteria) similar to *M. Tuberculosis*, and if tuberculosis grew progressively worse, filamentary structures were identified. Qualitative and quantitative characteristics of morphological types found in blood plasma are associated with the form, phase, occurrence of tuberculosis and the degree of intoxication; that's why these morphological types are viewed as mycobacteria. Scanning electronic microscopy of blood plasma allows to control the effectiveness of tuberculosis chemotherapy and reliable cessation of bacteria discharge and it also allows to prognosticate relapses and so on.

Key words: tuberculosis, L-transformants in blood plasma, scanning electron microscopy.

В предыдущих исследованиях [5, 6, 7] показано, что в плазме крови здоровых жителей Благовещенска циркулируют различные варианты L-форм бактерий, в основном элементарные тельца (ЭТ). Эта скрытая, без явных клинических проявлений бактериемия, разграничивает «практически здоровых» людей на две категории: иммунокомпетентных (без бактериемии) и иммунокомпрометированных (с бактериемией). В упрощенном виде у последней категории горожан условно выделены переходные стадии между здоровьем и начинающимся заболеванием: а) наличие в полях зрения от единиц до нескольких десятков ЭТ свидетельствует о напряжении физиологических резервов здоровья и периодических «сбоях» в звеньях иммунитета; б) присутствие в полях зрения многих десятков ЭТ, их конгломератов и единичных размножающихся ЭТ сигнализирует уже об истощении функциональных резервов и возрастании чувствительности к стрессорам; в) множество ЭТ, их конгломератов и репродуцирующих клеток в полях зрения отражает срыв адаптационных механизмов и переход функциональных нарушений в морфологические дефекты. В сущности, иммунокомпрометированные люди находятся «в «доклиническом состоянии». Сейчас полагают, что в развитых странах 20% населения страдает от сильного стресса. Им порождено 70% болезней, в том числе туберкулез. Из материалов государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия насе-

ния в Российской Федерации в 2011 г.» следует, что в России в 2011 г. впервые зарегистрировано 103817 случаев туберкулеза со значением заболеваемости 72,67 на 100 тыс. населения (в 2010 г. – 76,47 на 100 тыс. населения), причем, среди впервые выявленных больных 41,3% выделяли микобактерии (в 2010 г. – 41,1%). Как свидетельствуют материалы для государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2012 г.» по Амурской области, показатель заболеваемости туберкулезом в Амурской области в 2012 г. составил 109,66 на 100 тыс. населения, что на 2,8% больше, чем в 2011 г. (106,73 на 100 тыс. населения), а на долю первичных бактериовыделителей пришлось 27,4% (в 2011 г. – 25%). То есть, как бы не называли в России ситуацию по туберкулезу (напряженной, неблагоприятной), в действительности имеет место его пандемия. Ее причинами традиционно считаются низкий уровень жизни населения, миграция, алкоголизм, наркомания, лица без определенного места жительства, больные туберкулезом, вышедшие из заключения, значительный резерв инфекции и пр. Впрочем, подчеркивается [5], что росту туберкулеза способствовало реформирование системы медицинского обеспечения (сокращение медико- санитарных частей, здравпунктов, цеховой терапевтической службы и др.), приведшего к уменьшению масштабов и качества противотуберкулезных мероприятий. Отмеченные причинные факторы являются стрессорами. Активизируя гипоталамус, гипофиз, иные участки мозга, надпочечники и щитовидную железу, они, независимо от своей природы, требуют от организма перестройки к новым жизненным условиям [9].

Запускаются стрессовые реакции и возбудителем туберкулеза. У человека и животных его вызывают не одни классические *Mycobacterium tuberculosis* (эталонный штамм H37Rv), а *Mycobacterium tuberculosis complex*, состоящий из *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. caprae* и *M. pinnipedii*. Будучи факультативными внутриклеточными паразитами, они способны длительное время персистировать в организме. Но множественная лекарственная резистентность чаще встречается у быстро распространяющихся во всех странах штаммов *Beijing* (Бейджинг) и отличающихся гипервирулентностью, адгезией на альвеолах и обширным поражением легочной ткани с деструкцией и большой смертностью [10, 11, 13]. По данным Т.Х.Исаевой [4], штаммы *Beijing* часто изолируются от больных диссеминированной, кавернозной и фиброзно-кавернозной формами и казеозной пневмонией. Современные представления о *Mycobacterium tuberculosis complex* требуют совершенствования методов диагностики, поскольку бактериоскопия, культуральный, иммуноферментный, люминесцентный и цитологический методы недостаточно чувствительны и не позволяют судить о состоянии популяции микобактерий в организме, особенно их изменчивости. За рубежом сейчас широко используется автоматизированная система Bactec MGIT- 960, обеспечивающая быстрое (на 7-10

день) обнаружение микобактерий в жидкой питательной среде, система MB/VacT (рост микобактерий через 18,7 суток против 33,2 и более дней на плотной питательной среде Левенштейна-Йенсена) и др. [8]. Правда, их внедрение в России сдерживается высокой стоимостью оборудования (компьютер, инкубаторно-детекторные модули, флаконы с питательными средами). Более доступна в качестве экспресс-анализа полимеразная цепная реакция. Несмотря на недостатки она универсальна, высокочувствительна, специфична (100%), и в течение 4-5 часов выявляет единичные клетки или фрагменты ДНК возбудителя.

В настоящей статье представлены результаты электронномикроскопического изучения плазмы крови пациентов, госпитализированных по поводу активного туберкулеза легких в Амурской областной противотуберкулезный диспансер.

Материалы и методы исследования

Исследована плазма крови 26 пациентов обоего пола в возрасте от 27 до 70 лет. Из них у 2 больных диагностирован очаговый туберкулез в фазе инфильтрации, у 11 – инфильтративный в фазе распада и обсеменения, у 2 – диссеминированный в фазе распада, у 8 – фиброзно-кавернозный в фазе инфильтрации и обсеменения, у 3 – туберкулема. В мокроте 13 пациентов обнаружены микобактерии туберкулеза. В 1 случае основное заболевание осложнилось экссудативным плевритом, в 5 случаях – легочно-сердечной недостаточностью, у 3 пациентов туберкулезу сопутствовали сахарный диабет, язвенная болезнь желудка и 12-перстной кишки и мочекаменная болезнь. Повторно (в процессе лечения) плазма исследована у 17 (65,4%) лиц. Плазму отбирали в клинической лаборатории из образцов, направленных для биохимических исследований, и в количестве 0,1 мл наносили на поверхность ленты, закрепленной на торце специального устройства. Препарат просушивали, напыляли углеродом в вакуумной установке ВУП-4 и просматривали в сканирующих электронных микроскопах LEO 1420 (Германия) или JEOL ISM-35C (Япония).

Результаты исследования и их обсуждение

Из иллюстраций 1–6 видно, что в плазме крови больных всеми формами активного туберкулеза легких визуализируются множественные электронноплотные тельца сферической и овальной формы, с четкими ровными контурами, диаметром 0,15–0,32 мкм, без каких-либо минеральных включений на поверхности либо внутри. По электронной плотности, форме и размерам они соответствуют ЭТ L-форм бактерий или CWDB (cell wall-deficient/defective bacteria – бактерии с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой).

Согласно данным И.В.Елисеевой и соавт. [3], образующиеся при L-трансформации бактерий ЭТ имеют геном, трехслойную мембрану, рибосомы и находятся в шатком равновесии с иммунобиологической резистентностью организма. Главное – они не культивируются на питательных средах Левенштейна-Йенсена, Финн-2 и не просматриваются в световом микроскопе.

Одновременно среди них дифференцируются ЭТ в стадии деления (возможно, размножения) пополам, неравномерно пополам, в нескольких плоскостях или почкования с образованием дочерних особей меньшего диаметра. Атипичное деление (размножение) ЭТ подчеркивает их бактериальное происхождение, жизнеспособность, функционирование и неуязвимость для физиологических, гуморальных и клеточных защитных механизмов организма. Объединяясь друг с другом, либо не разделяясь при делении, тельца формируют различной величины и формы конгломераты, способные также продуцировать на своей поверхности дочерние тельца. В меньших количествах ЭТ встречаются при очаговом туберкулезе и мелких туберкулемах, в больших количествах – при распространении процесса на долю, все легкое, оба легких, особенно при наличии легочной деструкции. В плазме крови больных инфильтративным, фиброзно-кавернозным и особенно диссеминированным туберкулезом, в полях зрения помимо ЭТ встречаются тонкие длинные и короткие палочковидные клетки, которые отсутствуют в плазме здоровых лиц [5]. Нередки они и при распадающейся крупной туберкулеме. Присутствие таких клеток наряду с ростом численности или усиленным делением ЭТ позволяют предполагать, что все эти структуры являются микобактериями. Кроме того, при злокачественном течении фиброзно-кавернозного ту-

беркулеза легких на фоне интенсивной химиотерапии в плазме появляются множественные, неодинаковые по длине и ширине прямые или слегка извитые нити, также продуцирующие тельца (рис. 6). По нашим наблюдениям, появление нитей является признаком неблагоприятного исхода заболевания уже в ближайшие 1-3 недели. Таким образом, активные формы вторичного туберкулеза легких более постоянно, чем казалось, сопровождаются бактериемией, обусловленной типичными *M. tuberculosis* и их трансформированными вариантами. Многие аспекты бактериемии нуждаются в изучении, однако она и на этом уровне имеет важное прикладное значение. Так, по уменьшению или увеличению численности ЭТ и палочковидных клеток по сравнению с исходным количеством, можно судить об эффективности проводимого лечения, а улучшение рентгенологической картины в легких и отсутствие роста микобактерий при культуральном исследовании материала на фоне сохранения в плазме крови большого количества ЭТ или палочковидных клеток не означает, что больной абациллирован. Наоборот, это указывает на сохранение активности туберкулезного процесса, его скором обострении, опасности больного для окружающих и пр. К сожалению, электронномикроскопические исследования доступны лишь крупным научным и лечебным учреждениям.

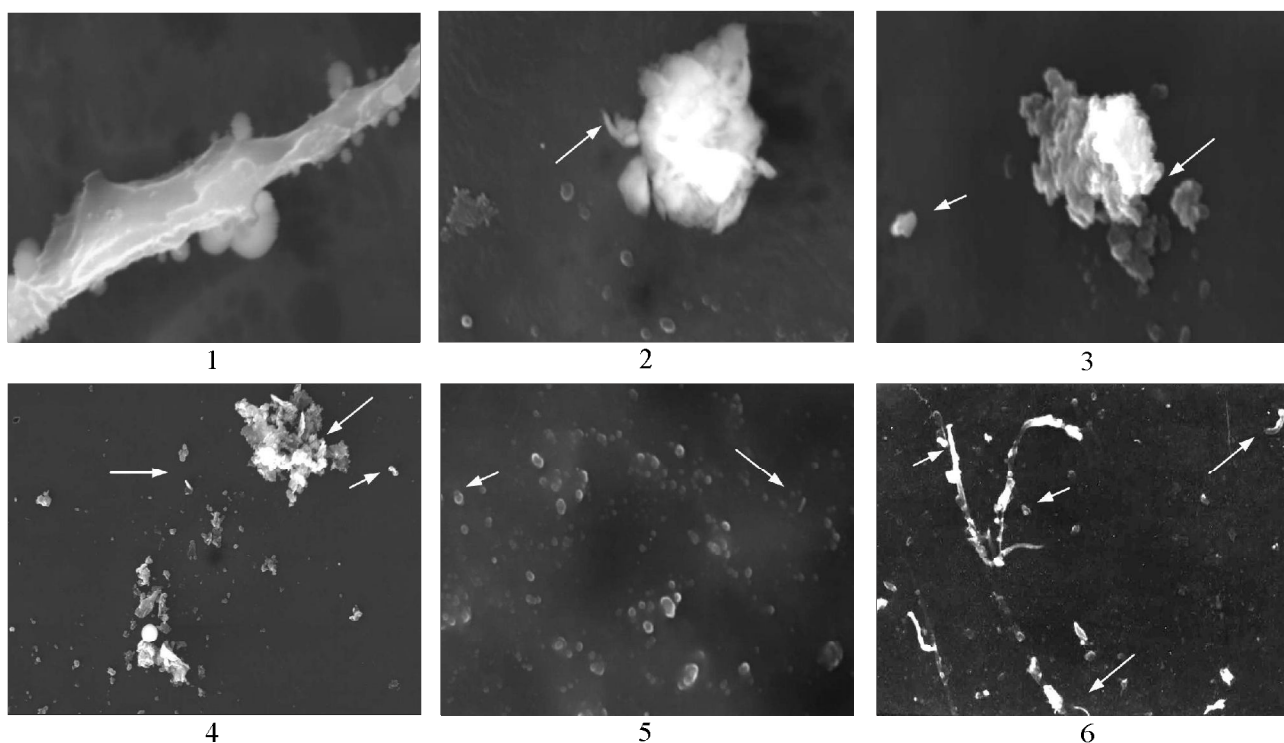


Рис. 1-6. Сканирующая электронная микроскопия плазмы крови у больных туберкулезом легких: 1 – ЭТ при очаговой форме ($\times 7000$); 2 – ЭТ при инфильтративной форме ($\times 4000$); 3 – ЭТ при туберкулеме ($\times 7260$); 4 – ЭТ при диссеминированной форме ($\times 1530$); 5 – ЭТ при обострении фиброзно-кавернозной формы ($\times 6000$); 6 – ЭТ и нитевидные структуры при неблагоприятном исходе фиброзно-кавернозной формы ($\times 1200$). Короткими стрелками отмечены ЭТ в состоянии деления, длинной стрелкой – палочковидные клетки.

Бактериemia, возникающая при первичном инфицировании микобактериями, не опасна, но создает условия для латентной персистенции возбудителя и от-

сроченных эндогенных рецидивов. Механизмы выживания в организме человека патогенных бактерий, включая *M. tuberculosis*, полностью не выяснены. Боль-

шинство исследователей считает, что они персистируют в виде ЭТ [1, 12]. Тем самым подчеркивается вездесущность, мобильность и адаптивная стратегия бактерий. Всплеск туберкулеза в мире спровоцировали чрезвычайные стрессоры: военные конфликты, национальные противоречия, природные катастрофы и пр., в России – тяжелый социально-экономический кризис вследствие распада СССР. Пришедшие ему на смену капитализация и реформирование привычного жизненного ритма, психологическое напряжение перед неизвестностью активировали стрессовые механизмы у людей и индуцировали дистрессовые состояния и иммунопатологию. В первую очередь, у иммунокомпрометированных лиц. Психическая нагрузка вызвала у них реактивацию эндогенного инфекта в специфических гранулёмах лимфатических узлов, лёгких, почек, костей, суставов и других локализаций с реверсией ЭТ в исходные микобактерии. Превратившись в факторы риска, ревертанты усугубили иммуносупрессию организма, истощили его резервы и предоставили широкую возможность для манифестации как других персистирующих бактерий, так и для реализации экзогенного инфицирования при контакте с больными туберкулезом. Полагают, что даже тяжелое прогрессирование процесса у заболевших туберкулезом легких обусловлено различными агрессивными стрессорами, в том числе штаммами *Beijing* [1].

Выводы

1. С помощью сканирующей электронной микроскопии у пациентов с активным туберкулезом легких обнаружена бактериемия в виде ЭТ, их агрегатов, дочерних особей, палочковидных клеток (микобактерий), а при прогрессировании туберкулеза – нитевидных структур.

2. Количественно-качественные характеристики обнаруженных в плазме крови морфотипов сопряжены с формой, фазой, распространенностью туберкулезного процесса и степенью интоксикации, что в целом расширяет представления о патогенезе туберкулеза.

3. Сканирующая электронная микроскопия плазмы крови позволяет контролировать эффективность химиотерапии туберкулеза, достоверность прекращения бактериовыделения, прогнозировать рецидивы и пр.

ЛИТЕРАТУРА

1. Механизмы выживания бактерий / О.В.Бухарин [и др.]. М.: Медицина, 2005. 363 с. .
2. Васильева Л.С., Филиппова Т.П. Дистресс в патогенезе прогрессирующих форм туберкулеза легких // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2006. №6. С.202–208.
3. О роли латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека / И.В.Елисеева [и др.] // Анналы Мечнивского Института. 2006. №1. С.12–44.
4. Исаева Т.Х. Течение и эффективность лечения впервые выявленных больных туберкулезом легких в зависимости от генотипа *M. tuberculosis*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2012. 25 с.
5. Катола В.М. Бактериальные формы в плазме

крови здоровых людей // Дальневост. журн. инфекц. патол. 2011. №19. С.41–44.

6. Катола В.М. Особенности бессимптомной бактериемии у практически здоровых людей // Авиакосм. и экол. медицина. 2012. №2. С.67–69.

7. Катола В.М. Об инфицированности крови в норме и при патологии // Бюл. физиол. и патол. дыхания. 2013. Вып.47. С.111–116.

8. Культуральные методы диагностики туберкулеза: учебное пособие / под ред. В.В.Ерохина. М.-Тверь: Триада, 2008. 208 с.

9. Психофизиология: учебник для ВУЗов / под ред. Ю.И.Александрова. СПб.: Питер, 2001. 496 с.

10. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains / P.J.Bifani [et al.] // Trends Microbiol. 2002. Vol.10, №1. P.45–52

11. Domingue G.J., Woody H.B. Bacterial Persistence and Expression of Disease // Clin. Microbiol. Rev. 1997. Vol.10, №2.P.320–344.

12. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers / K.Kremer [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol.42, №9. P.4040–4049.

13. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes / B.Lopez [et al.] // Clin. Exp. Immunol. 2003.Vol.133, №1. P.30–37.

REFERENCES

1. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El-Registan G.I. *Mekhanizmy vyzhivaniya bakteriy* [Mechanisms of bacteria survival]. Moscow: Meditsina; 2005.
2. Vasil'eva L.S., Filippova T.P. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* 2006; 6:202–208.
3. Eliseeva I.V., Babich E.M., Volyanskiy Yu.L., Sklyar N.I., Belozerskiy V.I. *Annali Mechniv'skogo Institutu* 2006; 1:37–40.
4. Isaeva T.H. *Techenie i effektivnost' lecheniya vpervye vyyavlennykh bol'nykh tuberkulezom legkikh v zavisimosti ot genotipa M. tuberculosis: avtoreferat dissertatsii kandidata meditsinskikh nauk* [The course and the effectiveness of treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis patients depending on the genotype of *M. tuberculosis*: abstract of thesis...candidate of medical sciences]. Moscow; 2012.
5. Katola V.M. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii* 2011; 19:41–44.
6. Katola V.M. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina* 2012; 2:67–69.
7. Katola V.M. *Bülleten' fiziologii i patologii dyhaniya* 2013; 47:111–116.
8. Erokhin V.V., editor. *Kul'tural'nye metody diagnostiki tuberkuleza* [Cultural methods of tuberculosis diagnosis]. Moscow-Tver': Triada; 2008.
9. Aleksandrov Yu.I., editor. *Psikhofiziologiya* [Psychophysiology]. St. Petersburg: Piter; 2001.
10. Bifani P.J., Mathema B., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains // *Trends Microbiol.* 2002;

10(1):45–52.

11. Domingue G.J., Woody H.B. Bacterial Persistence and Expression of Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10(2):320–344.

12. Kremer K., Glynn J.R., Lillebaek T., Niemann S., Kurepina N.E., Kreiswirth B.N., Bifani P.J., van Soolingen D. Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers. *J. Clin. Mi-*

crobiol. 2004; 42(9):4040–4049.

13. López B., Aguilar D., Orozco H., Burger M., Espitia C., Ritacco V., Barrera L., Kremer K., Hernandez-Pando R., Huygen K., van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol* 2003; 133(1):30–37.

Поступила 02.08.2013

Контактная информация

Виктор Моисеевич Какола,

кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник,

Институт геологии и природопользования Дальневосточного отделения РАН,

675000, г. Благовещенск, пер. Релочный, 1.

E-mail: katola-amur@list.ru

Correspondence should be addressed to

Viktor M. Katola,

MD, PhD, Leading staff scientist,

Institute of Geology and Nature Management of Far Eastern Branch RAS,

1 Relochniy Lane, Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation.

E-mail: katola-amur@list.ru