

УДК 582.288:616.8-009.6:612.017

**А.Є. Богомолів,
С.В. Зайков****ВИВЧЕННЯ МІТОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
АНТИГЕННИХ КОМПЛЕКСІВ УМОВНО
ПАТОГЕННИХ ГРИБІВ**

Вінницький національний медичний університет ім. М.І.Пирогова

Ключові слова: гіперчутливість уповільненого типу, умовно патогенні гриби, клітинна ланка імунітету**Key words:** hypersensitiveness of slow type, conditionally-pathogenic fungi, cellular link of immunity

Резюме. Исследованы результаты внутрикожного введения митогенов условно патогенных грибов *Alternaria*, *Aspergillus* микст, *Cladosporium*, *Chrisonilla*, *Monilia*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea* у 120 больных туберкулезом разных типов и форм процесса и в контрольной группе. Установлено, что для грибов *Alternaria alternata*, *Chrysonilia sitophyla*, *Monililia sitophyla*, *Aspergillus mxt* (*A.fumigatus*, *A.niger*), *Penicillum sp.div* и туберкулина степень силы связи между значениями внутрикожных проб и результатами реакции ингибиции миграции лейкоцитов была умеренной, а для грибов *Cladosporium* и *Botrytis cinerea* – слабой. У больных разными формами легочного туберкулеза ответ на митогены Т-звена иммунитета в сравнении со здоровыми лицами является существенно сниженным, особенно у хронических больных. В результате стандартного лечения туберкулеза показатели реагирования на митогены улучшаются. Предлагается использование метода определения гиперчувствительности к условно патогенным грибам в качестве простого и информативного теста для оценки состояния клеточного звена иммунитета.

Summary. Results of intraskin injection of mitogens of conditionally-pathogenic fungi *Alternaria*, *Aspergillus* mixt, *Cladosporium*, *Chrisonilla*, *Monilia*, *Penicillium*, *Botrytis cinerea* of 120 patients with tuberculosis (TB) of different types and forms of process and in a control group were studied. It was set that for the fungi *Alternaria alternata*, *Chrysonilia sitophyla*, *Monililia sitophyla*, *Aspergillus mxt* (*A.fumigatus*, *A.niger*), *Penicillum sp.div* and tuberculin a degree of connection between the findings of intraskin tests and IML was moderate; for the fungi *Cladosporium* and *Botrytis cinerea* a degree of connection was weak. In patients with different forms of pulmonary tuberculosis a response on mitogens of T-cell immunity is substantially lower as compared to healthy persons especially in patients with chronic forms of tuberculosis. As a result of standard TB treatment the indexes of reacting on mitogens become better. It is proposed to use the method of hypersensitivity determination to conditionally-pathogenic fungi as a simple informative test to estimate the state of cellular link of immunity.

На даний момент майже ні в кого не залишається сумнівів, що поряд із стандартною хіміотерапією курс лікування туберкульозу повинен включати призначення препаратів для імунокорекції. Це пов'язано з формуванням МБТ-індукованих вторинних імунодефіцитних станів у пацієнтів з туберкульозом легень, вираженість яких тісно корелює з типом процесу та обширністю ураження [1, 5]. Згідно з існуючими уявленнями та стандартами діагностики, до схем виявлення вторинних імунодефіцитних станів як скринінг-тести або тести першого рівня входять шкірні тести з мітогенами [2,3]. Вони дозволяють оцінити здатність Т-лімфоцитів викликати реакцію гіперчутливості сповільненого типу при внутрішньошкірному введенні антигену. Оскільки негативна реакція може бути наслідком не тільки

порушення імунітету, а й відсутності попереднього контакту з даним антигеном, проби проводять з набором широко розповсюджених мітогенів – дерматофітіном, трихофітіном, антигеном вірусу епідемічного паротиту, туберкуліном, правцевим та дифтерійним анатоксином тощо. При цьому негативні реакції на декілька з розповсюджених антигенів у хворих свідчить про виражену недостатність клітинного імунітету [1,2,4,9]. У практиці лікаря-фтизіатра найбільш частим прикладом цього є негативний результат проби Манту з 2 ТО туберкуліну ППД-Л у хворих із тяжкими формами туберкульозу, що характеризує розвиток у них стану анергії. Важливу роль тут відіграють також дані анамнезу – обтяжений алергологічний, імунологічний, спадковий анамнез, які формують критерії недостовірності подібних досліджень [9].

Метод діагностування порушення клітинної ланки імунітету за допомогою внутрішньошкірного введення мітогенів відомий з 90-х років минулого сторіччя [4, 6, 9]. На даний момент застосовується мультитест для діагностики стану клітинного імунітету, куди входять правцевий та дифтерійний анатоксини, антиген стрептококу, туберкулін, антигени *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* та *Proteus mirabilis*. Існують окремі роботи щодо використання комплексу фітогемаглютинін-туберкулін для діагностування стану клітинної ланки імунітету у хворих на панкреатит [10]. Зважаючи на особливості імунної відповіді, вельми цікавим, на нашу думку, є питання можливості використання набору антигенних комплексів умовно патогенних грибів як мітогенів Т-клітинної ланки імунітету для діагностування імунних порушень у різних груп хворих. Слід зауважити, що в нормі у 75-90% здорових людей, що проживають на території розповсюдження даних умовно патогенних грибів, спостерігається позитивна реакція на внутрішньошкірне тестування з їх антигенними комплексами. Проба Манту у хворих на туберкульоз теж має бути в 100% випадків позитивною при відсутності анергії – стану, що викликаний імунодефіцитом та відзначається відсутністю реакції на введення туберкуліну [1].

Антигени умовно патогенних грибів відносяться до неспецифічних Т-мітогенів – речовин, здатних індукувати активацію популяції Т-лімфоцитів незалежно від антигенної специфічності їх рецепторів. Враховуючи літературні дані щодо розповсюдженості умовно патогенних грибів у країнах Європи та Україні [7, 8], з усього переліку можливих нами було вибрано 7 умовно патогенних грибів: *Alternaria alternata*, *Cladosporium*, *Monilia sitophyla*, *Chrysogilia sitophyla*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus mxt* (*A.fumigatus*, *A.niger*), *Penicillium sp.div*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження серед 120 хворих на туберкульоз було проведене у 2006-2009 роках на базі Вінницького обласного клінічного протитуберкульозного диспансеру (ВОКПТД) та 40 здорових добровольців. До числа обстежуваних хворих увійшли дорослі пацієнти віком 18 – 60 років із різними формами (вогнищевою, інфільтративною, дисемінованою та фіброзно-кавернозною) і типами (вперше виявлений, рецидив та хронічний туберкульоз) легеневого туберкульозного процесу. Хворі на туберкульоз позалегової локалізації в дослідження включені не були. До контрольної групи увійшли 40 здорових добровольців віком 20 – 41 рік. Пацієнти групи

спостереження та контрольної групи не мали істотних відмінностей за статеві-віковими параметрами ($p < 0,05$), що дозволило проводити відповідні порівняння між ними. Групу спостереження відповідно до поставлених цілей було розділено на 3 підгрупи чисельністю по 40 пацієнтів у кожній. Так, до підгрупи А було віднесено хворих на вперше діагностований туберкульоз легень, до підгрупи В – на рецидив туберкульозу, до підгрупи С – на хронічний туберкульоз легень. Кількісний розподіл пацієнтів із різними типами процесу наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Розподіл хворих досліджуваних груп за характером захворювання на туберкульоз

Клінічні форми	Підгрупа А	Підгрупа В	Підгрупа С	Усього обстежено
Вогнищева	14	13	0	27 (22,5%)
Інфільтративна	14	15	0	29 (24,1%)
Дисемінована	12	11	24	47 (39,1%)
Фіброзно – кавернозна	0	1	16	17 (14,3%)
Усього	40	40	40	120

На першому етапі обстеження були детально зібрані анамнез хвороби і анамнез життя з метою виключення обтяження алергологічного анамнезу у пацієнтів, проводився аналіз лікування хворих та детальне опитування з метою виключення прийому глюкокортикоїдів, аналіз історій хвороби (або амбулаторних карток контрольної групи) з метою виключення супутньої патології, що могла б призвести до розвитку вторинного імунодефіцитного стану в обстежуваних.

Тестування з антигенними комплексами умовно патогенних грибів виконувалось у два етапи – після надходження пацієнта в стаціонар до початку лікування стандартним курсом хіміотерапії для кожної категорії хворих та перед випискою пацієнтів зі стаціонару через 3 місяці лікування (кінець активної стаціонарної фази лікування). Методика виконання тестів була стандартною для внутрішньошкірного введення

антигенів грибів згідно з інструкцією до медичного застосування препарату. З метою оцінки реакції гіперчутливості негайного типу місця ін'єкцій оглядалися через 20 хвилин після введення мітогенів. Для вивчення реакції гіперчутливості уповільненого типу проводилась оцінка місцевих реакцій на шкірі в місцях введення мітогенів через 24, 48, 72 години після ін'єкцій. Згідно з існуючими нормами реакція оцінювалась у міліметрах. Реакція на введення мітогенів класифікувалась як негативна, слабкопозитивна, позитивна, різко позитивна, дуже різко позитивна та сумнівна згідно з стандартами оцінки реакцій внутрішньошкірних тестів [2, 9]. Паралельно з тестуванням умовно патогенними грибами проводились проба Манту з 2 ТО туберкуліну ППД-Л та реакція інгібіції міграції лейкоцитів для кожного з мітогенів. Отримані дані були оброблені статистично стандартними методами з вираховуванням середніх арифметичних, стандартних похибок, середніх квадратичних відхилень. Достовірність різниці показників оцінювалась за ранговим критерієм кореляції Спірмена.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зважаючи на невелику кількість випадків реакцій негайного типу (всього у 10 випадках у групі спостереження та у 4 випадках у контрольній групі), будь-які порівняння для цього типу імунної відповіді було робити недоцільно. Алергічні реакції негайного типу в даних випадках не були предметом дослідження та випадали рідко, що пояснюється типом імунопатологічних реакцій у відповідь на мітогени умовно патогенних грибів та туберкулін. Саме тому ці випадки розцінювались нами як особливість імунного статусу пацієнтів та діагностичного навантаження не несли.

За результатами проведення проби Манту з 2 ТО туберкуліну як при первинному, так і при повторному обстеженні було виявлено, що при порівняльній динаміці реакції на введення через 24, 48 та 72 години найбільша вираженість реакції, як і очікувалося, спостерігалась через 72 години після проведення тесту (рис. 1). Так, зважаючи на це, результати туберкулінової проби через 72 годин після її проведення вважались нами, як і іншими дослідниками, найбільш діагностично достовірними.

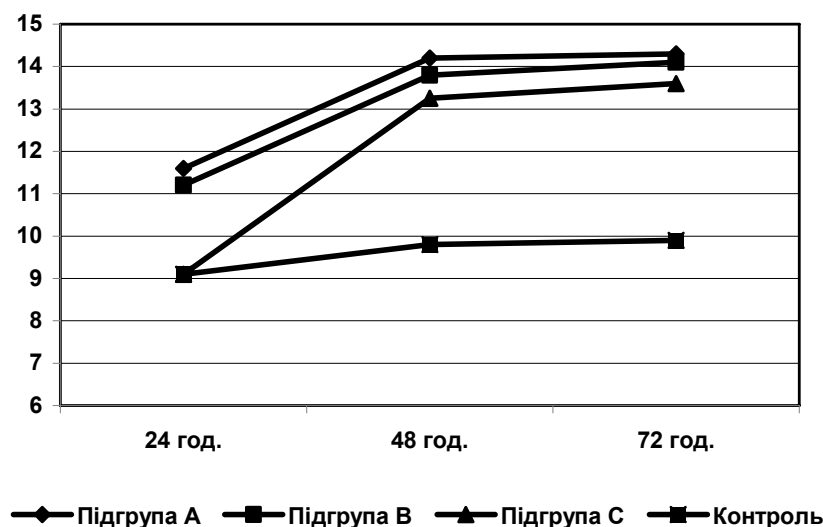


Рис. 1. Динаміка вираженості результату проби Манту з 2 ТО ППД-Л (в мм)

В усій структурі обстежених за допомогою туберкулінодіагностики позитивна реакція Манту спостерігалась у 100% пацієнтів контрольної групи, підгруп А і В та у 71% (10 осіб) підгрупи С. Така анергія до туберкуліну, на нашу думку, була пов'язана з вираженим імунodefіцитом осіб із хронічним туберкульозом та підтверджувала існуючі в літературі уявлення про патогенез туберкульозу.

При проведенні порівняльного аналізу результатів туберкулінової проби в різних обстежених групах виявлено, що існувала суттєва різниця між її вираженістю у хворих групи спостереження та пацієнтів контрольної групи ($p < 0,05$). Між тим, різниця результатів тестування істотно відрізнялась лише між підгрупами А та С і В та С. Істотної різниці між результатами проби Манту з 2 ТО ППД-Л у пацієнтів з груп А та В

нами не виявлено. При порівняльному аналізі результатів тестування за допомогою проби Манту у хворих із різним типом процесу виявлено, що найбільша вираженість туберкулінової проби спостерігалась у осіб із вогнищевим туберкульозом (середній діаметр папули склав $14,7 \pm 2,8$ мм), найменша – у осіб із фіброзно – кавернозним туберкульозом (середній розмір папули - $10,2 \pm 2,1$ мм). Це, на нашу думку, і зумовлює різницю результатів проб із туберкуліном у різних підгруп групи спостереження.

Що ж до гіперчутливих реакцій уповільненого типу, в якій грибові алергени виступали як мітогени, то ці дані наведено у таблиці 2. Як видно з неї, найбільш часто позитивні результати випадали при тестуванні мітогенами *Botrytis cinerea*, *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. як в досліджуваних, так і в контрольній групі. Ми вираховували середнє значення позитивних тестів із мітогенами в обох групах. Так, у підгрупі А

(n=40) середня кількість позитивних тестів з мітогенами умовно патогенних грибів склала 2,95 на 1 людину до лікування та 4,5 після нього. В підгрупі В (n=40) середня кількість позитивних тестів із мітогенами грибів склала 2,65 на 1 людину до лікування та 3,875 після нього. В підгрупі С (n=40) середня кількість позитивних тестів при оцінці результату внутрішньошкірного введення мітогенів умовно патогенних грибів склала 1,75 на 1 пацієнта та 2,375 після нього. В контрольній групі (n=40) при оцінці результатів внутрішньошкірного введення 7 грибкових мітогенів середня кількість позитивних тестів на 1 людину в групі склала 6,65. Відповідні дані наведені нами на рисунку 2. Як видно з нього, результати реагування осіб з туберкульозом легень до і після лікування відрізнялися, що було пов'язано з приглушенням туберкульозного процесу та покращенням клінічної картини захворювання.

Таблиця 2

Кількість позитивних результатів шкірної реакції гіперчутливості уповільненого типу з грибковими мітогенами

Мітогени	Хворі на туберкульоз			Контрольна група N=40
	підгрупа А N=40	підгрупа В N=40	підгрупа С N=40	
<i>Aspergillus</i> sp.	19 (28)	18 (28)	12 (18)	37
<i>Alternaria</i> sp.	16 (24)	14 (26)	11(14)	40
<i>Botrytis cinerea</i>	25 (30)	21 (26)	12 (16)	38
<i>Cladosporium</i> sp.	20 (26)	16 (21)	11(14)	38
<i>Chrysonilia sitophila</i>	16 (22)	8 (14)	10 (13)	37
<i>Penicillium</i> sp.	15 (24)	21 (24)	6 (10)	36
<i>Monilia sitophila</i>	17 (26)	8 (16)	8 (10)	40
Всього	118 (180)	106 (155)	70 (95)	266

Примітка: в дужках вказані результати повторного тестування через 90 днів лікування

Одночасно з шкірним тестуванням антигенними комплексами грибів та туберкуліном хворим було виконано реакцію інгібіції міграції лейкоцитів (ІМЛ) з антигенними детермінантами грибів та туберкуліном. Встановлено, що для грибів *Alternaria alternata*, *Chrysonilia sitophyla*, *Monilia sitophyla*, *Aspergillus mxt* (*A.fumigatus*, *A.niger*), *Penicillium* sp.div та туберкуліну ступінь сили зв'язку між значеннями внутрішньошкірних проб та ІМЛ був помірним (значення коефіцієнта рангової кореляції Спірмена склали 0,53-0,64). Для грибів *Cladosporium* та *Botrytis cinerea* ступінь зв'язку був слабким (значення коефіцієнта рангової кореляції Спірмена склали 0,32 та 0,38 відповідно).

Таким чином, ми отримали дані, що свідчать про доцільність застосованого нами підходу щодо визначення стану імунітету за допомогою мітогенів Т-ланки імунітету. Ступінь кореляції між результатами шкірних проб з більшістю умовно патогенних грибів та реакцією ІМЛ до них дозволяє стверджувати про специфічність подібного тестування. Отже, на наш погляд, такий підхід можна застосовувати у вітчизняних протитуберкульозних закладах. Також важливо, що жодного випадку небажаних реакцій (місцевого або загального типу) при проведенні шкірного тестування з грибковими мітогенами виявлено не було.

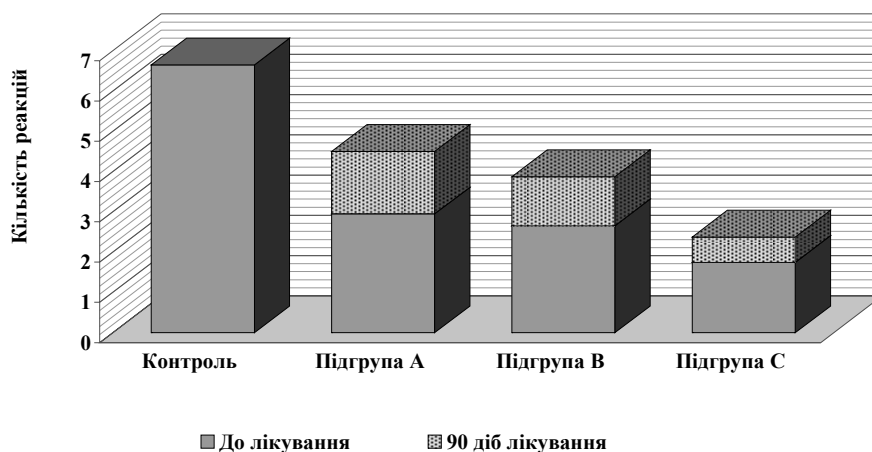


Рис. 2. Середня кількість позитивних реакцій гіперчутливості у хворих на різні форми туберкульозу легень та у пацієнтів контрольної групи

ВИСНОВКИ

1. Грибкові алергени можуть бути застосованими як мітогени Т-ланки імунітету.
2. Найбільш інформативними як маркери Т-ланки імунітету виявилися алергени грибів *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*, *Chrysosporium sitophila*, *Monilia sitophila*, найменш інформативними - *Cladosporium* та *Botrytis cinerea*. Комплексна оцінка результатів шкірного тестування з грибковими мітогенами є найбільш інформативною.

3. У хворих на різні форми легеневого туберкульозу відповідь на мітогени Т-ланки імунітету, у порівнянні зі здоровими особами, є істотно зниженою. В більшій мірі це стосується хворих на хронічні форми туберкульозу.

4. При проведенні лікування туберкульозу за існуючими стандартами показники реагування шкіри на мітогени покращуються, що свідчить про покращення стану клітинної ланки імунітету хворих.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авербах М.М. Повышенная чувствительность замедленного типа и инфекционный процесс. – М.: Медицина, 1974. – 203с.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и алергология. – К.: Полиграф плюс, 2006. – 481с.
3. Лоллор Г., Фишер Т., Адельман Д. Клиническая иммунология и алергология Г. Лоллор-мл. – М.: Новая книга, 2000. – 363с.
4. Особенности иммунитета у больных с различными формами туберкулеза легких / Н.А.Хонина, С.Д. Никонов, С.В. Шпилевский и др. // Проблемы туберкулеза. – 2000. – № 1. – С. 30 – 32.
5. Патология иммунитета: причина или следствие туберкулезной инфекции? / В.В. Новицкий, О.И. Уразова, А.К. Стрелис и др. // Бюлетень сибирской медицины. – 2006. – №2. – С. 70 – 75.
6. Пухлик Б.М. Руководство по практической иммунодиагностике и иммунотерапии. – Винница: Иммунологический центр, 1992. – 118 с.
7. Соболев А.В. Алергические заболевания органов дыхания, вызываемые грибами: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. - СПб., 1997. - 41с.
8. Соболев А.В., Васильева Н.В. Микогенная аллергия (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика) // Алергология. Частная алергология / Под ред. Г.Б. Федосеева. - СПб.: Нордмедиздат, 2001. – Т. 2. - С. 200–211.
9. Титов Л.П., Батян А.Н. Способ определения состояния Т-клеточного иммунитета: авторское свидетельство № 1455315 СССР // Открытия и изобретения. - 1989. - № 4. - С. 211.
10. Экспресс-диагностика клеточного звена иммунитета при некротической форме острого панкреатита [Електронний ресурс] / А.В. Тарасенко, С.А. Алексеев, Л.П. Титов, Д.А. Черношей // Научные доклады – Режим доступа http://www.bsnu.by/index.php?option=com_content&view=article&id=1400:-l&catid=103:s22009&Itemid=196.

