*На правах рукописи*

**СТАЦУК Татьяна Анатольевна**

**ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА И ДРУГИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КАРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КЛЕТОК БРОНХИАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ**

**14.01.16 –фтизиатрия**

**Автореферат**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва 2013**

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Российской академии медицинских наук (директор – заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, профессор В.В. Ерохин)

**Научный руководитель:**

Ловачева Ольга Викторовна, доктор медицинских наук, профессор

**Научный консультант:**

Сычева Людмила Петровна, доктор биологических наук, профессор

**Официальные оппоненты:**

Корнилова Зульфира Хусаиновна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» Российской академии медицинских наук, заведующая отделением новых информационных технологий

Стаханов Владимир Анатольевич, доктор медицинских наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздравсоцразвития РФ, заведующий кафедрой фтизиатрии

**Ведущая организация:** Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздравсоцразвития РФ

Защита состоится «11» июня 2013 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.052.01 при ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»» РАМН по адресу: 107564, Москва, Яузская аллея, д.2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» РАМН

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_2013г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук Юхименко Наталья Валентиновна

**ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность проблемы.** Вследствие патоморфоза отмечается значительное сходство клинико-рентгенологических, лабораторных и даже морфологических проявлений таких заболеваний легких как туберкулез, саркоидоз, пневмонии и онкологических процессов, что создает определенные трудности в их дифференциальной диагностике (Хоменко А.Г. и соавт., 1986; Евгущенко Г.В., 1986; Илькович М.М., 1998; Бурухина Л.В. и соавт., 2001г.; Степанян И.Э. и соавт., 2007; Лепеха Л.Н.и соавт., 2007; Ерохин В.В. и соавт., 2007; Азина Г.М. и соавт., 2011; Антипова А.В. и соавт., 2011; Гришин В.К., 2011; Демихова О.В. и соавт., 2011; Коломиец В.М., 2011; Лесунова И.В., Корецкая Н.М., 2011; Лаушкина Ж.А., Филимонов П.Н., 2011; Процик Л.М., 2011; Якимова М.А. и соавт., 2011).

В связи с этим разработка дополнительных методов морфологической диагностики туберкулеза и других заболеваний легких приобретает особую актуальность (Флигиль Д.М. и соавт., 2011).

Важное место в диагностическом процессе занимают различные инструментальные исследования, позволяющие получить материал из патологического очага в легких. Работами ряда авторов показано, что бронхологические методы являются мало травматичными и обладают высокой информативностью (Филиппов В.П. и соавт., 1997; Борисов С.Е., 2000; Стрелис А.К., 2006; Азина Г.М. и соавт., 2007; Ловачева О.В. и соавт., 2007; Кузиев А.А. и соавт.; 2011; Серов О.А. и соавт.; 2011). Эффективность цитологического метода исследования бронхобиоптатов не вызывает сомнений (Николаева Г.М., 2004; Евгущенко Г.В. и соавт., 2006; Шапиро Н.А., 2008).

Однако при периферическом расположении патологических процессов в легких, при перибронхиальной их локализации, незначительном объеме поражения эффективность биопсийных манипуляций снижается (Филиппов В.П. и соавт., 1997; Борисов С.Е., 2000; Стрелис А.К., 2006; Евгущенко Г.В. и соавт., 2006; Азина Г.М. и соавт., 2007; Ловачева О.В. и соавт., 2007). Это объясняется тем, что в материал биопсии не попадают этиологически значимые клетки и микробная флора. Состояние же всегда присутствующих в биоптатах клеток бронхиального эпителия, если и оценивается, то лишь в плане наличия неспецифического воспаления и дистрофии, то есть процессов, сопровождающих практически все заболевания легких.

Морфологические аномалии ядер известны давно (Алов И.А., 1972) и описаны в опухолевых клетках экспериментальных животных (Кравцов В.Ю. и соавт., 1999; Кузоватов С.Н. и соавт., 2000); у здоровых людей в назальном, буккальном и уротелиальном эпителии (Сычева Л.П. и соавт., 2005, Сычева Л.П., 2007); у онкологических больных в клетках назального и буккального эпителия (Бяхова М.М. и соавт., 2011), в том числе после применения химиотерапии (Нерсесян А.К. и соавт., 2000); у больных аллергозами (Айриян А.П. и соавт., 1990) и бронхиальной астмой (Бяхова М.М., 2008). У больных туберкулезом легких ядерные аномалии изучали только в лимфоцитах периферической крови (Ковязина А.И. и соавт., 1981, Ильинских Н.Н.и соавт., 2005; Rao V.V. et al., 1990; Masjedi M.R. et al., 2000), в том числе при противотуберкулезной химиотерапии (Jaju M. еt al., 1983; Roman C.I. et al., 1983; Jaju M. еt al., 1984; Rao V.V. et al., 1991; Ekmekci A., Sayli A., 1995; Masjedi M.R. et al., 2000; Новицкий В.В. и соавт., 2005).

Как видно в литературе нет данных о состоянии ядер клеток бронхиального эпителия, об использовании их в клинической практике при влиянии таких факторов как нозология, длительность заболевания, химиотерапия.

Бронхологические методы позволяют в 100% случаев получить клетки бронхиального эпителия для исследования, а близость их к патологическому процессу предполагает наличие в них выраженных изменений.

Отличия по частоте ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия у больных туберкулезом, неспецифическими и онкологическими заболеваниями легких могут являться дополнительным критерием в дифференциальной диагностике этих заболеваний при отсутствии информативных морфологических признаков, поэтому изучение и внедрение новых методов морфологической диагностики является актуальной задачей фтизиатрии.

**Цель исследования:** совершенствование дифференциальной диагностики туберкулеза легких с онкологическими и неспецифическими заболеваниями органов дыхания путем определения различных видов кариологических показателей в клетках бронхиального эпителия.

**Задачи исследования:**

1. Определить у больных туберкулезом легких виды аномалий ядра бронхиального эпителия.

2. Установить влияние противотуберкулезной химиотерапии при разных сроках на частоту и особенности ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия.

3. Исследовать влияние туберкулезного процесса на кариологические показатели в клетках бронхиального эпителия. Провести сравнительный анализ кариологических показателей в клетках бронхиального эпителия больных туберкулезом легких и различных эпителиальных клетках здоровых людей.

4. Исследовать у больных неспецифическими заболеваниями легких частоту и особенности ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия и сопоставить их с таковыми у больных туберкулезом легких.

5. Исследовать у больных онкологическими заболеваниями легких частоту и особенности ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия и сопоставить их с таковыми у больных туберкулезом легких.

6. Для дифференциальной диагностики туберкулеза, онкологических и неспецифических заболеваний легких определить доверительный интервал частоты кариологических показателей в клетках бронхиального эпителия.

**Научная новизна.** Впервые у больных туберкулезом легких изучены ядерные аномалии в клетках бронхиального эпителия. У больных туберкулезом легких при разных сроках химиотерапии проведен сравнительный анализ кариологических показателей в клетках бронхиального эпителия. Установлено, что у длительно леченных больных туберкулезом увеличивается частота кариологических показателе в клетках бронхиального эпителия.

Впервые у больных неспецифическими и онкологическими заболеваниями легких проведено исследование частоты и особенностей ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия и сравнение их с таковыми у больных туберкулезом легких. Установлено, что при туберкулезе легких и неспецифических заболеваниях легких частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия не имеет достоверных отличий и достоверно ниже, чем при онкологических процессах в легких. В результате этого впервые разницу кариологических показателей в клетках бронхиального эпителия использовали в дифференциальной диагностике: туберкулез – онкологические заболевания легких.

**Практическая ценность работы.** В дифференциальной диагностике туберкулеза и онкологических заболеваний легких определение ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия является дополнительным критерием и может проводиться в материале бронхобиоптатов, не содержащих этиологически значимых клеток и структур.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. У больных туберкулезом легких в клетках бронхиального эпителия встречаются все известные виды ядерных аномалий ядра: микроядро, ядерная протрузия, многоядерность, перетяжка ядра.

2. У больных туберкулезом легких при сроке химиотерапии более 6 месяцев достоверно увеличивается частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия по сравнению с нелеченными больными туберкулезом и леченными до 6 месяцев.

3. У больных туберкулезом легких и неспецифическими заболеваниями частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия достоверно не различается.

4. У больных туберкулезом легких частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия существенно и достоверно ниже, чем у больных онкологическими заболеваниями легких.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты проведенных исследований внедрены в практику ФГБУ «ЦНИИТ» РАМН. Совместно с ФГБУ «НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. Н.А. Сысина» МЗ и СР РФ разработаны и изданы методические рекомендации «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека», М., 2005. Получен патент на изобретение №2272290 (зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 20 марта 2006 г. по заявке №2004113078) «Способ дифференциальной диагностики туберкулеза и злокачественных поражений легких».

**Апробация работы.** Апробация работы проведена на совместном заседании отдела фтизиатрии и клинико-диагностического отдела. Материалы исследования доложены на Научной сессии «Экологические риски здоровья населения на Крайнем Севере» (Надым, 2007 г.), 2-х научно-практических конференциях ФГБУ ЦНИИТ РАМН (2007; 2012 гг.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе – 6 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационное исследование состоит из введения, главы обзора литературы, описания материала и методов исследования, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста. Работа иллюстрирована 25 таблицами, 31 рисунком. Указатель литературы включает 215 источника (119 отечественных и 96 зарубежных авторов).

**СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Для решения поставленных задач проанализированы результаты обследования 248 больных, находившихся на амбулаторном и стационарном лечении ЦНИИТ РАМН с 2001 по 2011 гг. Из них было мужчин - 142 (52,3%) человека и женщин - 106 (47,7%) , возраст обследуемых от 18 до 82 лет. В исследование включались только некурящие больные.

Всем больным проводилось комплексное обследование, включавшее использование методов обязательного диагностического минимума, а также дополнительных методов исследования.

Согласно верифицированному клиническому диагнозу получилось 3 группы пациентов: группу больных туберкулезом (ТБ) органов дыхания составили 162 (65,3%) человека, онкологическими заболеваниями легких (ОЗЛ) – 45 (18,2%), неспецифическими заболеваниями легких (НЗЛ) – 41 (16,5%).

Все больные ТБ были разделены на 3 подгруппы в зависимости от сроков противотуберкулезной терапии (ПТТ):

- 1 подгруппа ТБ (1ТБ) - 58 (35,8%) пациентов, не получавших лечение или леченных до 1 месяца;

- 2ТБ - 48 (29,7%) пациентов, получавших химиотерапию от 1 месяца до 6 месяцев;

- 3ТБ – 56 (34,5%) пациентов с химиотерапией более 6 месяцев без существенной динамики.

Из 58 больных 1ТБ никогда не получали ПТТ 26 (16,1%) больных, остальные 32 (19,7%) лечились препаратами 1 ряда по I режиму (приказ МЗ РФ №109 март 2003 года); больные 2ТБ и 3ТБ – лечились препаратами 1 и 2 ряда по индивидуальному режиму с учетом лекарственной переносимости пациента и данных о лекарственной устойчивости возбудителя.

В группе ТБ преобладал инфильтративный туберкулез –74 человека (45,7%) и фиброзно-кавернозный туберкулез (55/34,0%). У остальных больных были следующие клинические формы туберкулеза: очаговый - 2 (1,2%), диссеминированный – 12 (7,4%), а также туберкулез внутригрудных лимфоузлов – 10 (6,2%) и туберкулема – 9 (5,6%).

Двустороннее поражение было у 128 (79,0%) больных ТБ; наличие деструкции легких установлено при компьютерной томографии у 122 (75,3%) больных ТБ.

Наличие бактериовыделения зафиксировано методом микроскопии у 101 (62,3%) больных ТБ, методом посева - у 147 (90,7%) больных ТБ.

При бронхологическом обследовании больных ТБ патологии в бронхах специфического характера не выявлено (в исследование вошли больные без специфического поражения бронхов).

При цитологическом исследовании бронхобиоптатов дистрофия бронхиального эпителия (БЭ) отмечалась у 154 (95,1%) больных ТБ, нейтрофильно-лимфоидная инфильтрация - у 136 (84,0%), этиологически значимые структуры (эпителиоидные клетки, клетки Пирогова-Лангханса, эпителиоидно-клеточные гранулемы) – у 118 (72,8%), казеозный некроз – у 87 (53,7%), КУМ обнаружены у 102 (62,9%) больных.

В группу НЗЛ вошли больные с такими заболеваниями как пневмония – 19 (46,3%) и саркоидоз – 22 (53,7%).

У больных пневмонией была односторонняя локализация процесса, деструкции в легких не было. У больных саркоидозом процесс был всегда двусторонним и проявлялся аденопатией и/или диссеминацией, деструкции в легких не было.

В группе больных ОЗЛ имелись рентгенологические проявления в виде округлых образований, инфильтратов, диссеминации, у 5 (11,1%) больных наблюдалось поражение ВГЛУ, у 2 (4,4%) больных - полости распада. Встречались следующие виды опухолей: плоскоклеточный рак – 10 (22,2%), аденокарцинома – 16 (35,6%), недифференцированный мелкоклеточный рак – 5 (11,1%), неклассифицированный рак – 4 (8,8), лимфогранулематоз – 10 (22,2%).

Клинический диагноз у больных всех групп (248 пациентов) был верифицирован морфологически и/или микробиологически. Причиной обращения пациентов в клинику была необходимость дифференциальной диагностики с туберкулезом.

Материал для цитологического исследования, включавшего анализ кариологических показателей (КП), получали при бронхоскопии методом браш-биопсии. Препараты окрашивали по методу Паппенгейма и анализировали с помощью светового микроскопа в проходящем свете. Подсчитывали от каждого больного по 1000 клеток БЭ без видимых повреждений и среди них определяли долю клеток с ядерными аномалиями. Результат выдавали в промилях (‰).

Клетки БЭ в материале браш-биопсии присутствуют всегда в достаточном количестве, при этом браш-биопсия выполняется из бронха пораженного сегмента, точное попадание в патологический очаг необязательно, как при получении этиологически значимых клеток. Во всех случаях для кариологического анализа отобраны препараты, не содержащие морфологически значимых клеток.

К клеткам с ядерными аномалиями (ЯА) в соответствии с Методическими рекомендациями «Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека» (2005) относили:

**-** Клетку с микроядром (микроядро (МЯ) – небольшое (не более 1/3 диаметра ядра) ДНК-содержащее образование).

- Клетку с ядерной протрузией (ядерная протрузия (ЯП) – различного вида вырост ядра – шаровидный, нитевидный или иной формы).

- Многоядерную клетку (МК) - клетка с двумя и более отдельно лежащими ядрами.

- Клетку с перетяжкой ядра (ПЯ) - клетка с ядром, имеющим центральную или частично смещенную к одному из полюсов борозду, а также клетка с бобовидной формой ядра.

**РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

Установлено, что у больных ТБ в БЭ встречаются все выше перечисленные известные формы ЯА. У больных ТБ достоверных различий в частоте ЯА в клетках БЭ у женщин и мужчин не выявлено. Частота ЯА в каждой подгруппе не имеет достоверных отличий при разных формах туберкулеза (таблица 1). Это позволило проводить дальнейший анализ КП в клетках БЭ без учета по формам туберкулеза и гендерным отличиям.

Таблица 1. Суммарная частота клеток со всеми видами ядерных аномалий по формам туберкулеза внутри каждой подгруппы.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Формы туберкулеза | 1ТБ (58 больных)  M±m‰ | 2ТБ (48 больных)  M±m‰ | 3ТБ  (56 больных)  M±m‰ |
| Очаговый | 36,87±0,04 | - | - |
| Туберкулез ВГЛУ | 39,35±0,87 | 40,65±0,67 | - |
| Инфильтративный | 37,44±1,21 | 40,56±1,16 | 46,74±1,55 |
| Диссеминированный | 39,52±0,70 | 42,72±0,89 | 48,32±1,27 |
| Туберкулема | 36,90±0,57 | 39,71±0,78 | 45,71±0,88 |
| Фиброзно-кавернозный | 40,12±0,22 | 43,85±0,58 | 49,87±1,11 |
| Суммарная доля клеток со всеми видами ЯА (групповые значения) | 38,02±0,99 | 41,02±1,38 | 47,13±1,21 |

В таблице 2 представлены данные о КП в клетках БЭ у больных разных подгрупп ТБ.

Таблица 2. Кариологические показатели у больных туберкулезом разных подгрупп.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Кариологические показатели | 1ТБ  (58 больных)  M±m‰  (1) | 2ТБ  (48 больных)  M±m‰  (2) | 3ТБ  (56 больных)  M±m‰  (3) |
| Доля клеток с микроядрами | 0,12±0,04 | 0,19±0,06 | 0,25±0,06 |
| Доля клеток с ядерныи протрузиями | 15,94±0,66 | 17,02±0,85 | 21,86±0,92  (р1и3; 2и3<0,05) |
| Суммарная доля клеток с цитогенетическими нарушениями | 16,07±0,66 | 17,19±0,85 | 22,11±0,93  (р1и3; 2и3<0,05) |
| Доля многоядерных клеток | 11,38±0,74 | 11,71±0,890 | 11,95±0,89 |
| Доля клеток с перетяжкой ядра | 10,79±0,58 | 11,94±0,82 | 12,98±0,95 |
| Суммарная доля многоядерных клеток и клеток с перетяжкой ядра | 22,22±1,0 | 23,67±1,19 | 24,80±1,20 |
| Суммарная доля клеток со всеми видами ядерных аномалий | 38,02±0,99 | 41,02±1,38 | 47,13±1,21  (р1и3; 2и3<0,05) |

Достоверная разница имела место только по частоте клеток с ЯП при сравнении 1ТБ и 3ТБ (р<0,05) и 2ТБ и 3ТБ (р<0,05) (15,93±0,66‰; 17,02±0,85‰ и 21,86 ±0,92‰ соответственно 1ТБ, 2ТБ, 3ТБ).

Частота клеток с МЯ была недостоверно выше в 3ТБ по отношению к 1ТБ и 2ТБ. Доля МК была практически одинаковой во всех подгруппах ТБ. Доля клеток с ПЯ была недостоверно выше в 3ТБ. При оценке суммарной доли клеток со всеми видами ЯА отмечалось достоверное увеличение (р1и3; 2и3<0,05) в 3 ТБ (47,13±1,21‰) относительно 1ТБ (38,02±0,99‰) и 2ТБ (41,02±1,38‰).

Таким образом, при оценке КП в клетках БЭ установлено, что между 1ТБ и 2ТБ достоверных различий нет.

1ТБ и 3ТБ, также как 2ТБ и 3ТБ статистически достоверно отличались по следующим показателям:

- частоте клеток с ЯП (в 1,4 раза и в 1,3 раза соответственно);

- суммарной доле клеток с цитогенетическими нарушениями (в 1,4 раза и в 1,3 раза соответственно);

- суммарной частоте клеток со всеми видами ЯА (в 1,3 раза и в 1,2 раза соответственно).

Самая высокая частота ЯА имеется у больных 3ТБ, то есть у пациентов, принимавших ПТТ более 6 месяцев. При этом основной вклад в КП дают клетки с ЯП, характеризующие наличие факторов цитогенетического действия. Этими факторами могут являться как само существование туберкулезного процесса, так и воздействие ПТТ на длительном промежутке времени. Различить степень влияния этих двух факторов в исследованиях, проводимых в клинике, невозможно, так как обычно длительность болезни и ПТТ взаимосвязаны. Лишь отдельные клинические наблюдения свидетельствуют, что превалирующим является цитогенетическое действие ПТТ.

КП в клетках БЭ у здоровых людей не установлены, так как для проведения бронхоскопии необходимы соответствующие показания (рентгенологические и/или клинические проявления болезни), поэтому мы использовали данные Л.П. Сычевой («Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека» // Медицинская генетика.-2007), полученные по клеткам буккального, назального и уротелиального эпителиев здоровых лиц. Поскольку частота ЯА в клетках различного эпителия у здоровых людей не имеет достоверных отличий, то указанные показатели можно рассматривать как ориентировочные для эпителиальных клеток.

Для определения влияния самого туберкулезного воспаления на возникновение ЯА в клетках БЭ мы сравнили данные больных 1ТБ, то есть нелеченных или леченных до 1 месяца, с КП в различных эпителиальных клетках здоровых людей (таблица 3).

У больных 1ТБ частота клеток БЭ с МЯ (0,12±0,04‰) несколько меньше, чем в буккальном (0,24±0,03‰) и достоверно ниже (р<0,05), чем в назальном (0,35±0,03‰) и уротелиальном (0,31±0,11‰) эпителиях здоровых лиц.

Частота клеток с ЯП достоверно выше (р<0,05) в клетках БЭ в 1ТБ (15,94±0,66‰), чем в клетках буккального, назального и уротелиального эпителия в норме (1,17±0,29‰; 2,67±1,34‰ и 8,42±1,48‰ соответственно).

Доля МК в 1ТБ (11,38±0,74‰) достоверно превышает (р<0,05) этот показатель в клетках буккального (1,06±0,07‰), назального (2,29±0,11‰) и уротелиального (1,21±0,44‰) эпителия в норме.

Доля клеток с ПЯ в клетках БЭ в 1ТБ (10,79±0,58‰) также достоверно выше (р<0,05), чем в буккальном (1,70±0,09‰), назальном (2,94±0,12‰) и уротелиальном (1,94±0,53‰) эпителии в норме.

При оценке суммарной доли клеток со всеми видами ЯА отмечается достоверное повышение (р<0,05) данного показателя в клетках БЭ в 1ТБ (38,02±0,99‰) относительно буккального в 9,1 раз (4,17±0,40‰), назального в 4,7 раз (8,14±1,46‰) и уротелиального в 3,2 раза (11,99±1,99‰) эпителия в норме.

Таким образом, выявлено, что в клетках БЭ больных ТБ достоверно чаще наблюдаются ЯА, чем в эпителиальных клетках здоровых людей. При этом увеличение доли клеток с ЯП показывает цитогенетическое действие туберкулезного воспаления, увеличение доли МК и клеток с ПЯ (признаки пролиферации) демонстрируют компенсаторный ответ на значительное повреждение.

Таблица 3. Кариологические показатели в клетках бронхиального эпителия больных 1 подгруппы ТБ и в различных эпителиальных клетках здоровых лиц.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Кариологические  показатели | 1ТБ  (58 чел.)  M±m‰  (1) | Частота кариологических показателей в эпителиальных клетках здоровых людей\*  M±m‰ | | | р |
| Буккальный эпителий  (205 чел.)  (2) | Назальный  эпителий  (205 чел.)  (3) | Уротели-альный эпителий  (19 чел.)  (4) |
| Доля клеток с микроядрами | 0,12±0,04 | 0,24±0,03 | 0,35±0,03 | 0,31±0,11 | <0,05  1и3  1и4 |
| Доля клеток с ядерными протрузиями | 15,94±0,66 | 1,17±0,29 | 2,67±1,34 | 8,42±1,48 | <0,05  1и2  1и3  1и4 |
| Сумма клеток с цитогенетичес-кими нарушениями | 16,07±0,66 | 1,41±0,31 | 3,01±1,34 | 8,73±1,47 | <0,05  1и2  1и3  1и4 |
| Доля многоядерных клеток | 11,38±0,74 | 1,06±0,07 | 2,29±0,11 | 1,21±0,44 | <0,05  1и2  1и3  1и4 |
| Доля клеток с перетяжкой ядра | 10,79±0,58 | 1,70±0,09 | 2,84±0,12 | 1,94±0,53 | <0,05  1и2  1и3  1и4 |
| Сумма многоядерных клеток и клеток с перетяжкой ядра | 22,22±1,0 | 2,76±0,09 | 5,13±0,12 | 3,16±0,52 | <0,05  1и2  1и3  1и4 |
| Суммарная доля клеток со всеми видами ядерных аномалий | 38,02±0,99 | 4,17±0,40 | 8,14±1,46 | 11,99±1,99 | <0,05  1и2  1и3  1и4 |

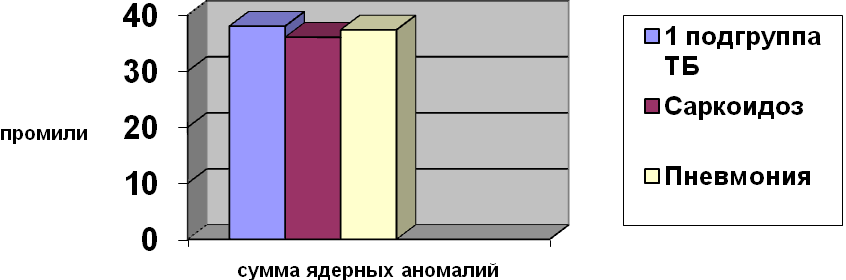
\*Данные Сычевой Л.П., 2007г.

При проведении кариологического анализа у больных НЗЛ установлено, что при саркоидозе и пневмонии нет достоверных гендерных различий ни по одному КП.

Далее частоту ЯА в клетках БЭ больных НЗЛ сравнивали с таковыми у больных ТБ. Так как на практике приходиться дифференцировать впервые выявленный туберкулез легких с саркоидозом и пневмонией, то соответственно среди подгрупп больных туберкулезом была выбрана 1ТБ.

Установлено, у больных 1ТБ, саркоидозом и пневмонией достоверных отличий нет ни по одному КП: доля клеток с МЯ при саркоидозе - 0,14±0,07‰, при пневмонии - 0,21±0,10‰, в 1ТБ - 0,10±0,04‰; доля клеток с ЯП при саркоидозе - 14,18±1,21‰, при пневмонии - 16,26±1,28‰, в 1ТБ - 15,93±0,66‰; доля МК при саркоидозе - 11,09±1,01, при пневмонии - 10,21±1,17‰, в 1ТБ - 11,38±0,74‰; доля клеток с ПЯ при саркоидозе - 10,64±0,97‰, при пневмонии - 11,37±1,32‰, в 1ТБ - 10,79±0,58‰; суммарная доля клеток со всеми видами ЯА при саркоидозе - 36,05±1,63‰, при пневмонии - 37,37±1,50‰, в 1ТБ - 38,02±0,99‰ (рисунок 1).

Рисунок 1.Частота клеток бронхиального эпителия со всеми видами ядерных аномалий у больных 1 подгруппы ТБ и НЗЛ.



Таким образом, ЯА в клетках БЭ встречались у всех больных пневмонией и саркоидозом примерно с той же частотой, что у больных нелеченным или леченным не более 1 месяца ТБ (различия недостоверны). По этой причине КП не могут быть использованы в дифференциальной диагностике этих заболеваний.

При изучении КП у больных ОЗЛ установлено, что гендерных различий в частоте ЯА нет. У больных ОЗЛ доля клеток БЭ с ЯА достаточно высокая.

Доля клеток БЭ с МЯ была высокой при различных видах рака от 0,70+0,42‰ до 0,87+0,29‰ и практически в 2 раза меньше (р<0,05) при лимфогранулематозе (0,40+0,16‰).

Доля клеток с ЯП при всех видах рака была практически одинаковой от 40,25+4,53‰ до 45,80±3,37‰ и достоверно ниже (р<0,05) при лимфогранулематозе (32,30±1,68‰).

Доля МК была достоверно выше (р<0,05) при лимфогранулематозе (19,10±4,05‰), тогда как при различных видах рака она колебалась от 7,20±1,33‰ до 11,75±1,29‰.

Доля клеток с ПЯ также была достоверно выше (р<0,05) при лимфогранулематозе (26,20±3,56‰), чем при различных видах рака (10,00±1,41‰ - 15,80±2,02‰).

Суммарная доля клеток со всеми видами ЯА при всех видах рака была практически одинаковой (при плоскоклеточном раке – 69,30±2,51‰, аденокарциноме – 68,19±4,81‰, недифференцированном мелкоклеточном раке – 65,20±2,92‰, неклассифицированном раке – 67,50±6,34‰), а при лимфогранулематозе отмечался достоверно (р<0,05) самый высокий показатель - 77,80±4,75‰.

Таким образом, при оценке в клетках БЭ у больных ОЗЛ КП были высокими и примерно одинаковыми при всех видах рака легкого. При лимфогранулематозе отмечались наиболее высокие показатели за счет увеличения доли МК и клеток с ПЯ, являющихся признаками пролиферации. При этом при лимфогранулематозе достоверно снижена частота клеток с ЯП, характеризующих цитогенетические нарушения.

Поскольку дифференциальную диагностику ТБ и ОЗЛ следует проводить вне зависимости от сроков ПТТ, мы сравнили ЯА в клетках БЭ больных всех подгрупп ТБ со средними значениями ЯА больных ОЗЛ (таблица 4).

Таблица 4. Кариологические показатели в клетках бронхиального эпителия больных туберкулезом и онкологическими заболеваниями легких.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Кариологические показатели | 1ТБ  (58 больных)  M±m‰  (1) | 2ТБ  (48 больных)  M±m‰  (2) | 3ТБ  (56 больных)  M±m‰  (3) | ОЗЛ  (среднее  значение)  (45 чел.)  М±m‰  (4) | р |
| Доля клеток с микроядрами | 0,12±0,04 | 0,19±0,06 | 0,25±0,062 | 0,66±0,16 | <0,05  1и4  2и4  3и4 |
| Доля клеток с ядерными протрузиями | 15,94±0,66 | 17,02±0,85 | 21,86±0,92 | 40,78±2,12 | <0,05  1и4  2и4  3и4 |
| Суммарная доля клеток с цитогенетическими нарушениями | 16,07±0,66 | 17,19±0,85 | 22,11±0,93 | 41,44±2,19 | <0,05  1и4  2и4  3и4 |
| Доля многоядерных клеток | 11,38±0,74 | 11,71±0,890 | 11,95±0,89 | 12,62±1,16 | >0,05 |
| Доля клеток с перетяжкой ядра | 10,79±0,58 | 11,94±0,82 | 12,98±0,95 | 17,02±1,32 | <0,05  1и4  2и4  3и4 |
| Суммарная доля многоядерных клеток и клеток с перетяжкой ядра | 22,22±1,0 | 23,67±1,19 | 24,80±1,20 | 29,64±1,69 | <0,05  1и4  2и4  3и4 |
| Суммарная доля клеток со всеми видами ядерных аномалий | 38,02±0,99 | 41,02±1,38 | 47,13±1,21 | 70,18±2,20 | <0,05  1и4  2и4  3и4 |

При сравнении КП в клетках БЭ у больных ТБ и у больных ОЗЛ отмечено, что доля клеток с МЯ в 1ТБ, 2ТБ, 3ТБ (0,10±0,04‰, 0,19±0,06‰ и 0,25±0,06‰ соответственно) была достоверно меньше (р<0,05), чем в группе ОЗЛ (0,66±0,16‰).

Доля клеток с ЯП была достоверно выше (р<0,05) при ОЗЛ (40,78±2,12‰) по сравнению с 1ТБ (15,93±0,66‰), 2ТБ (17,02±0,85‰), 3ТБ (21,86±0,92‰).

Доля МК в группе ТБ и в группе ОЗЛ достоверно не отличалась.

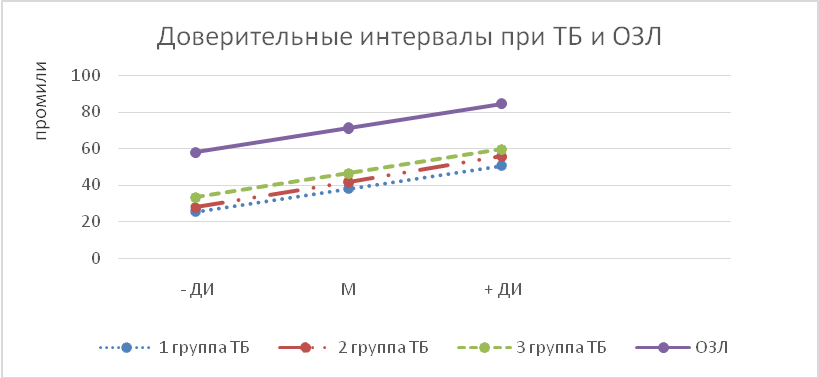
Доля клеток с ПЯ была достоверно выше (р<0,05) в группе ОЗЛ (17,02+1,32‰) по сравнению с группой ТБ (1ТБ - 10,79±0,58‰, 2ТБ - 11,94±0,82‰, 3ТБ - 12,98±0,95‰).

Суммарная доля клеток со всеми видами ЯА в группе ОЗЛ (70,18±2,20‰) достоверно (р<0,05) превышала этот показатель в группе ТБ (1ТБ – в 1,8 раз (38,02±0,99‰); 2ТБ – в 1,7 раз (41,02±1,38‰); 3ТБ – в 1,5 раз(47,13±1,21‰)).

Таким образом, частота ЯА в клетках БЭ значительно и достоверно повышается при ОЗЛ по сравнению с ТБ по всем показателям, кроме доли МК.

Для использования кариологического анализа клеток бронхиального эпителия в дифференциальной диагностике ТБ и ОЗЛ был определен доверительный интервал (ДИ) суммарной доли клеток со всеми видами ЯА (рисунок 2).

Рисунок 2.



Установлено, что в 95% случаев в 1ТБ суммарная частота клеток БЭ со всеми видами ЯА была в диапазоне от 25,43 до 50,4‰ (95% ДИ 25,43 - 50,4‰), во 2ТБ – 95% ДИ 27,70 - 55,64‰, в 3ТБ – 95% ДИ 33,35 - 59,51‰, а при ОЗЛ – 95% ДИ 57,84 - 84,37‰. То есть, имеется наложение значений только между 3ТБ и ОЗЛ в промежутке от 57,84‰ до 59,51‰. Таким образом, данный метод можно использовать в дифференциальной диагностике ТБ и ОЗЛ: суммарную частоту клеток БЭ со всеми видами ЯА больше 60‰ считать характерной для ОЗЛ и проводить целенаправленные исследования для подтверждения диагноза. По этой методике в 2006 г. получен патент.

**ВЫВОДЫ**

1. У больных туберкулезом легких в клетках бронхиального эпителия наблюдаются все виды ядерных аномалий (микроядро, ядерная протрузия, многоядерность, перетяжка ядра).

2. Длительность противотуберкулезной химиотерапии оказывает влияние на частоту ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия. Суммарная доля клеток со всеми видами ядерных аномалий достоверно выше (р<0,05) у больных туберкулезом легких, принимавших противотуберкулезную химиотерапию более 6 месяцев (47,13±1,21‰) по сравнению с больными, лечившимися от 1 до 6 месяцев (41,02±1,38‰) и больными, нелечившимися или лечившимися не более 1 месяца (38,02±0,99‰). При этом основной вклад в этом показателе дают клетки с ядерными протрузиями (21,86 ±0,92‰; 17,02±0,85‰; 15,93±0,66‰ соответственно), характеризующие наличие фактора цитогенетического воздействия

3. Туберкулезная инфекция влияет на частоту кариологических показателей в клетках пораженного органа. Суммарная частота их в клетках бронхиального эпителия у больных нелеченным или леченным до 1 месяца туберкулезом легких (38,02±0,99‰) значительно и достоверно выше (р<0,05) за счет клеток с ядерными протрузиями, многоядерных клеток и клеток с ядерной перетяжкой, чем в эпителиальных клетках здоровых людей (в буккальном эпителии - 4,17±0,40‰, назальном - 8,14±1,46‰ и уротелиальном - 11,99±1,99‰).

4. У больных нелеченным или леченным до 1 месяца туберкулезом суммарная частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия (38,02±0,99‰) достоверно не отличается от таковой у больных неспецифическими заболеваниями легких (при саркоидозе - 36,05±1,63‰, при пневмонии - 37,37±1,50‰).

5. У больных туберкулезом органов дыхания частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия значительно и достоверно ниже, чем у больных онкологическим заболеваниями легких. Клетки со всеми видами аномалий ядра при онкологических заболеваниях легких составляют 70,18±2,20‰, а при туберкулезе органов дыхания нелеченном или леченном ТБ до 1 месяца - 38,02±0,99‰, при леченном от 1 до 6 месяцев - 41,02±1,38‰, при леченном более 6 месяцев– 47,13±1,21‰.

6. При дифференциальной диагностике туберкулеза и онкологических заболеваний легких следует учитывать, что суммарная доля клеток бронхиального эпителия со всеми видами ядерных аномалий более 60‰ характерна для онкологических заболеваний легких.

7. У больных различными видами рака легких увеличение кариологических показателей происходит за счет клеток, характеризующих цитогенетические нарушения (клеток с микроядрами и/или клеток с ядерными протрузиями), а у больных лимфогранулематозом – за счет клеток с признаками пролиферации (многоядерных клеток и/или клеток с перетяжкой ядра).

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

- При дифференциальной диагностике туберкулеза органов дыхания и онкологических заболеваний легких рекомендуется использовать кариологический анализ клеток бронхиального эпителия при отсутствии морфологически значимых клеток и структур.

- Для кариологического анализа клеток бронхиального эпителия следует использовать материал, полученный при бронхоскопии методом браш-биопсии. Окраску препарата проводить по методу Паппенгейма. Препараты анализировать с помощью светового микроскопа в проходящем свете. Подсчитывать от каждого больного по 1000 клеток без видимых повреждений. Результат выдавать в промилях.

- Наличие суммарной доли клеток со всеми видами ядерных более 60‰ характерно для онкологических заболеваний легких и должно вести к расширению диагностических мероприятий.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Стацук Т.А. Ядерные аномалии в клетках бронхиального эпителия в дифференциальной диагностике туберкулеза легких / Стацук Т.А., Коваленко М.А. // Актуальные вопросы туберкулёза и других гранулематозных заболеваний: сборник материалов научно-практической конференции молодых ученых, посвященной Всемирному дню борьбы с туберкулезом. – М. – 2005. - с.67.

2. Цитогенетический анализ клеток бронхоальвеолярного лаважа и биопсии слизистой бронха больных саркоидозом легких / Коваленко М.А.Сычева Л.П., Ловачева О.В., Стацук Т.А., Евгущенко Г.В., Журков В.С. // Медицинская генетика. – 2005. - Т.4, N5. - С.205.

3. Значение определения частоты ядерных протрузий в клетках бронхиального эпителия для дифференциальной диагностики туберкулеза и опухолей легких / Ловачева О.В., Сычева Л.П., Евгущенко Г.В., Стацук Т.А., Коваленко М.А. // Медицинская генетика. - Т.4, N5. – 2005. - С.220.

4. Оценка цитологического и цитогенетического статуса слизистых оболочек полости носа и рта у человека / Беляева Н.Н., Сычева Л.П., Журков В.С., Шамарин А.А., Коваленко М.А., Гасимова З.М., Нейманзаде И.К., Чуприна О.В., Шереметьева С.М., Можаева Т.Е., Олесинов А.А., Шенцева Е.В., Александрова В.П., Пономарева О.Ю., Горелова Ж.Ю., Александровский С.Б., Стацук Т.А. // Методические рекомендации. - М. – 2005. - 37 с.

5. Способ дифференциальной диагностики туберкулеза и злокачественных поражений легких. / Патент на изобретение №2272290, зарегистрировано в Государственном реестре изобретений РФ 20 марта 2006 г. по заявке №2004113078 / Евгущенко Г.В., Коваленко М.А., Ловачева О.В., Можаева Т.Е., Стацук Т.А., Сычева Л.П., Шереметьева С.М. // Официальный Бюл. Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. – 2006. - №8. - 5 с.

6. Дифференциальная диагностика туберкулеза и опухолей легких по материалам цитологических исследований бронхобиоптатов / Стацук Т.А., Ловачева О.В., Евгущенко Г.В., Сычева Л.П., Коваленко М.А., Шумская И.Ю. // Туберкулез в России год 2007: материалы 8 Российского съезда фтизиатров. – М. – 2007 - С 203.

7. Оценка цитогенетического статуса человека с использованием неинвазивного микроядерного метода / Сычева Л.П., Коваленко М.А., Бяхова М.М., Стацук Т.А., Алтаева А.А. // Экологические риски здоровью населения на Крайнем Севере: материалы научной сессии, Надым, 25 апреля 2007. – Сибпресс. – Тюмень, 2007. - С.127-130.

8. Стацук Т.А Частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия при туберкулезе и опухолях / Стацук Т.А., Ловачева О.В., Евгущенко Г.В. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2008. - №9. - С.76-77.

9. Цитогенетические повреждения клеток бронхиального эпителия у больных туберкулезом легких / Сычева Л.П., Ловачева О.В., Стацук Т.А., Евгущенко Г.В., Коваленко М.А. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. - №7. - С.35-38.

10. Кариологические показатели клеток бронхиального эпителия у больных туберкулезом, онкологическими и неспецифическими заболеваниями легких / Стацук Т.А., Ловачева О.В., Евгущенко Г.В., Сычева Л.П., Коваленко М.А. // Туберкулез и болезни легких – 2011 - №2 - С.30-35.

11. Частота ядерных аномалий в клетках бронхиального эпителия у больных туберкулезом / Стацук Т.А., Ловачева О.В., Евгущенко Г.В., Сычева Л.П., Коваленко М.А. // Туберкулез и болезни легких: труды IX съезда фтизиатров. - Москва, 2011. - №5. С.173.

**Список сокращений**

БЭ – бронхиальный эпителий

ВГЛУ – внутригрудные лимфоузлы

КП – кариологические показатели

МК – многоядерные клетки

МЯ – микроядро

НЗЛ – неспецифические заболевания легких

НИИ – научно-исследовательский институт

ОЗЛ – онкологические заболевания легких

ПТТ – противотуберкулезная терапия

ПЯ – перетяжка ядра

РФ – Российская Федерация

ТБ – туберкулез

ФГБУ – Федеральное государственное бюджетное учреждение

ЯА – ядерные аномалии

ЯП – ядерная протрузия