

# СМЯТОЩА И ДОБРАТА

4  
2002



## СТАН ФАГОЦИТАРНОЇ ТА ЦИТОКІНОВОЇ СИСТЕМ ПРИ ДИФТЕРІЇ

ВОЗІАНОВА Ж.І., СЕНЮК О.Ф., ЧЕПІЛКО К.І.,  
ГАРКАВА К.Г.

*Національний медичний університет, Київ  
кафедра інфекційних хвороб, зав. кафедрою академік АМН Возіанова Ж.І.  
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Науково-дослідний лабораторний центр НМУ  
вигідлення експериментальної і клінічної імунології*

ключові слова:

*дифтерія, цитокіни, фагоцити*

В Україні з 1991 року реєструвалося підвищення захворюваності на дифтерію, що розцінювалося як епідемія [1]. Пік захворюваності зареєстрований в 1995 році [2, 3, 4]. Кількість хворих на дифтерію в подальшому значно зменшилась, але зараз знову має місце помітне зростання захворюваності, що знову робить її актуальною.

Відомо, що збудники інфекційних захворювань є складними антигенними комплексами, інколи з кількома десятками детермінант, кожний із яких спричинює свою імунну відповідь [5, 6]. Патогенність збудника дифтерії, крім токсину, визначають нейрамінідаза, гіалуронідаза, ліпідні чинники та інші [7]. Сукупність цих чинників разом із змінами у гомеостазі, зокрема в імунному, формують феномен ендотоксикозу. Від наявності та виразності останнього, як відомо, залежить тяжкість клінічного перебігу дифтерії [8].

Структуру імунопатогенезу при інфекційному процесі, спричиненому дифтерійною паличкою, формують специфічні реакції антитоксичного та антибактерійного імунітету, а також чинники природної резистентності (фагоцитоз) [9, 10, 11]. Отже, метою нашої роботи було вивчення рівня порушень чинників неспецифічної резистентності у хворих на дифтерію різної тяжкості — фагоцитувальних клітин та цитокінів, що дозволить прогнозувати можливість розвитку різних несприятливих ускладнень.

І.І. Мечніков понад сто років тому вперше продемонстрував, що фагоцитоз є важливим чинником природного імунітету (І.І. Мечніков, 1892) і відіграє важливу роль у захисті організму від інфекцій. Між силою фагоцитарної реакції та стійкістю організму до захворювань існує чіткий паралелізм [12]. У циркулюючій крові лейкоцити є ефекторними клітинами фагоцитозу. Саме вони організують структурну основу природного системного та місцевого (на шкірі та слизових) імунітету, який забезпечує першу ланку захисту від антигенів та алергенів різної природи [13].

Причетність алергійного чинника до патогенезу дифтерії почала дискутуватися зовсім недавно. У механізмах розвитку алергії беруть участь, з одного боку, прозапальні цитокіни, а з іншого — біогенні аміни, які спричинюють різноманітні ознаки запальної реакції. Порушення, пов'язані зі збільшенням кількості цитокінів та біологічно активних речовин, можуть бути ранніми показниками чинників ризику ускладнень у зв'язку з тим, що вони набагато випереджають появу клінічних ознак.



Цитокини — це поліпептиди, які утворюються переважно в клітинах імунної системи [14]. Можливо, в нормі продукція цитокинів знаходиться в гармонійному співвідношенні зі своєю активністю. Практично всі відомі цитокини беруть участь в індукції та маніфестації стану алергії [15].

**Загальна характеристика хворих та методи дослідження.** У 128 дорослих осіб віком від 15 до 60 років вивчали особливості клінічного перебігу дифтерії. Серед госпіталізованих переважали хворі з середньотяжким — 65 випадків (50,8%) та тяжким перебігом дифтерії — 41 випадок (32,0%). Легкий перебіг спостерігався лише у 22 осіб (17,2%). Розповсюджений дифтерійний процес мав місце у 55 випадках (42,9%). Локалізований процес дифтерії — у 35 (27,3%) хворих та комбінований у 38 (29,8%) хворих. Контрольну групу становили 32 клінічно здорових особи.

Поряд з клінічними та бактеріологічними проводили цитохімічні дослідження з визначенням внутрішньоклітинної ферментативної активності нейтрофілів і моноцитів та імуноферментний аналіз (ELISA) для виявлення рівнів цитокинів (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN - $\alpha$ ). Визначення активності нейтрофілів і моноцитів за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ) здійснювали за Park і співавт. (1968) в модифікації Е.І. Шмельової і співавт. (1970). МКАТ (моноклональні антитіла) до цитокинів використані фірми "Sigma".

**Результати дослідження та їх обговорення.** З метою визначення якості адаптації обстежених хворих до інфекційного процесу, викликаного збудником дифтерії, на першому етапі вивчення стану гемато-імунного гомеостазу аналізували лейкограму. Результати, отримані при вивченні лейкограми у хворих на дифтерію, враховуючи тяжкість перебігу та динаміку, наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

**Показники лейкограми (нейтрофіли та моноцити) у хворих на дифтерію в динаміці при різних ступенях тяжкості**

Тяжкість перебігу/Кількість	Кількість клітин $\times 10^9/\text{л}$			
	Перший тиждень		Другий тиждень	
	Нейтрофіли	Моноцити	Нейтрофіли	Моноцити
Легкий перебіг (n=22)	5,87 $\pm$ 1,120*	0,55 $\pm$ 0,119*	5,16 $\pm$ 0,842*	0,39 $\pm$ 0,173
Середньотяжкий перебіг (n=65)	7,32 $\pm$ 1,077**	0,40 $\pm$ 0,046*	7,62 $\pm$ 1,393**	0,77 $\pm$ 0,077**
Тяжкий перебіг (n=41)	7,88 $\pm$ 1,212**	0,433 $\pm$ 0,058*	6,63 $\pm$ 1,298*	0,39 $\pm$ 0,048*
Контроль (n=32)	3,26 $\pm$ 0,138	0,27 $\pm$ 0,016	3,26 $\pm$ 0,138	0,27 $\pm$ 0,016

Примітка :

Нейтрофіли (паличкоядерні та сегментоядерні поліморфноядерні лейкоцити;

\*  $p < 0,05$  — вірогідність відмінності показників хворих на дифтерію від контролю;

\*\*  $p < 0,001$  — вірогідність відмінності показників хворих на дифтерію від контролю.

Отримані показники нейтрофілів та моноцитів хворих на дифтерію, що подані в табл. 1, свідчать про тенденцію збільшення їх кількості в міру наростання тяжкості перебігу дифтерійного процесу. Різниця між показниками обстежених хворих та контролю при їх порівнянні є достовірною ( $p < 0,05$ ). Для виявлення закономірностей змін фагоцитувальної активності нейтрофілів та моноцитів в НСТ-тесті у хворих на дифтерію проведено обстеження в динаміці (перший та другий тиждень захворювання). Отримані дані подано в таблицях 2 і 3.

Показники нейтрофілів та моноцитів в спонтанному тесті на першому тижні захворювання у хворих на дифтерію підвищувалися від легкого до тяжкого перебігу. Якщо їх порівняти з відповідними показниками групи контролю, то різниця між показниками є вірогідною з найвищим рівнем імовірності ( $p < 0,001$ ). Така ж картина спостерігається і в індукованому тесті. На другому тижні захворювання відповідні



показники нейтрофілів та моноцитів (в спонтанному тесті) при легкому перебігу продовжували зростати, що не можна сказати про них за середньотяжкого та тяжкого перебігу. При цьому отримані результати показників нейтрофілів та моноцитів зменшилися в 1,1 і 1,3 рази та в 1,8 і 5,5 рази відповідно порівняно з відповідними показниками першого тижня. В індукованому тесті показники фагоцитувальних клітин є теж достовірно ( $p < 0,05$ ) вищими порівняно з показниками контролю, а щодо відповідних показників першого тижня вони виявились нижчими в 1,1 і 1,8 та 1,9 і 2,9 рази за середньотяжкого та тяжкого перебігу. При легкому перебігу (другий тиждень) ці показники продовжували зростати.

Таблиця 2

**Показники НСТ - тесту нейтрофілів і моноцитів периферійної крові хворих на дифтерію (перший тиждень захворювання) з врахуванням тяжкості перебігу та групи контролю**

Групи обстежених	НСТ- тест (кількість клітин $\times 10^9/\Lambda$ )			
	Нейтрофіли		Моноцити	
	Спонтанний	Індукований	Спонтанний	Індукований
Легкий (n=22)	1,043 $\pm$ 0,089***	1,042 $\pm$ 0,162***	0,068 $\pm$ 0,002***	0,074 $\pm$ 0,04***
Середньотяжкий (n=65)	1,396 $\pm$ 0,002***	1,436 $\pm$ 0,042***	0,103 $\pm$ 0,012***	0,122 $\pm$ 0,008***
Тяжкий (n=41)	2,726 $\pm$ 0,038***	2,115 $\pm$ 0,012***	0,209 $\pm$ 0,005***	0,127 $\pm$ 0,065***
Контроль	0,194 $\pm$ 0,058	0,260 $\pm$ 0,057	0,012 $\pm$ 0,005	0,015 $\pm$ 0,005

Примітка:

\*\*\* $p < 0,001$  — вірогідність відмінності показників досліджених груп від контролю понад 99 %.

Таблиця 3

**Показники НСТ - тесту нейтрофілів і моноцитів периферійної крові хворих на дифтерію (другий тиждень захворювання) з врахуванням тяжкості перебігу та групи контролю**

Групи обстежених	НСТ- тест (кількість клітин $\times 10^9/\Lambda$ )			
	Нейтрофіли		Моноцити	
	Спонтанний	Індукований	Спонтанний	Індукований
Легкий (n=22)	1,483 $\pm$ 0,04***	1,091 $\pm$ 0,088***	0,110 $\pm$ 0,014***	0,056 $\pm$ 0,003***
Середньотяжкий (n=65)	1,244 $\pm$ 0,112***	1,314 $\pm$ 0,093***	0,058 $\pm$ 0,006**	0,063 $\pm$ 0,037***
Тяжкий (n=41)	2,158 $\pm$ 0,364***	1,141 $\pm$ 0,159***	0,038 $\pm$ 0,012*	0,043 $\pm$ 0,004**
Контроль	0,194 $\pm$ 0,058	0,260 $\pm$ 0,057	0,012 $\pm$ 0,005	0,015 $\pm$ 0,005

Примітки:

\* $p < 0,05$  — вірогідність відмінності показників досліджуваних груп від контролю;

\*\* $p < 0,01$  — вірогідність відмінності показників досліджуваних груп від контролю;

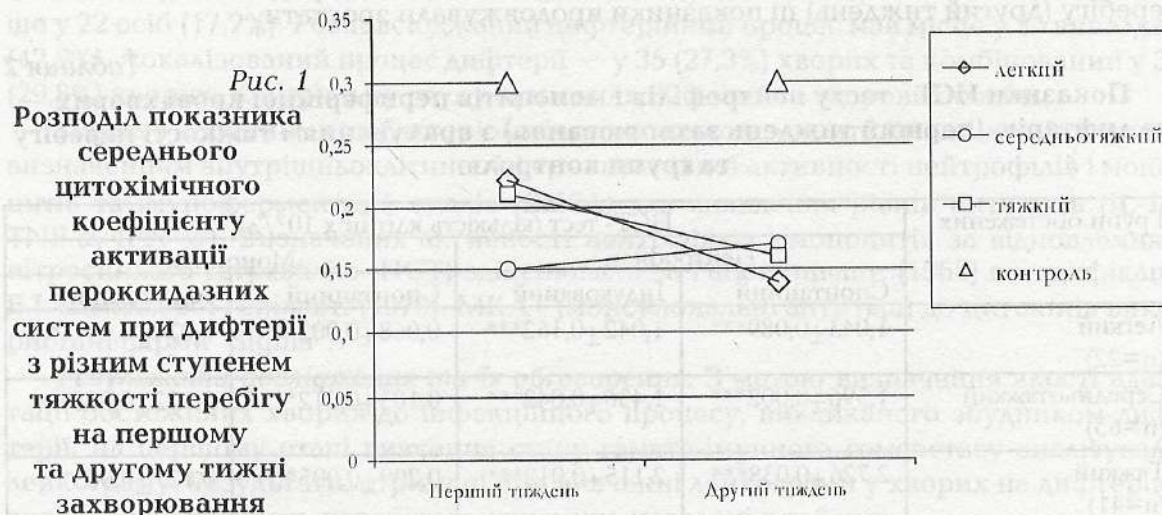
\*\*\* $p < 0,001$  — вірогідність відмінності показників досліджуваних груп від контролю.

Паралельно визначався середній цитохімічний коефіцієнт активації пероксидазних систем, який в нормі дорівнює  $0,3 \pm 0,03$ . Він був практично однаковим при всіх ступенях тяжкості: так при легкому —  $0,161 \pm 0,03$ , середньотяжкому —  $0,156 \pm 0,02$  та тяжкому —  $0,188 \pm 0,04$ , і різниця між показниками була вірогідною ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем. Якщо розглядати цей показник в динаміці (перший та другий тиждень захворювання), то отримали такі дані (рис. 1).

З рис. 1 видно, що при легкому та тяжкому перебігу дифтерії на першому тижні захворювання показник СЦК практично однаковий, але на другому тижні він зменшувався в 1,7 та 1,3 рази відповідно. При середньотяжкому цей показник вия-



вився найменшим на першому тижні. На другому тижні він навпаки (порівняно з легким та тяжким перебігом) продовжував зростати і практично був однаковим з відповідним показником при тяжкому перебігу. Але показник СЦК як на першому, так і на другому тижні захворювання був знижений порівняно з контролем. Таким чином, знижена активація пероксидазних систем при дифтерії різних ступенів тяжкості вказує на зниження функції фагоцитувальних клітин під час інфекційного процесу і, можливо, персистенції чужорідних агентів в них.



Примітка: СЦК — середній цитохімічний коефіцієнт

Отримані результати можуть свідчити про те, що при дифтерійному процесі на його початку (на початку його клінічних проявів) в крові підвищується кількість нейтрофілів та моноцитів (див. табл.1), виникає прогресивний зсув лейкоцитарної формули. З початку запального процесу йде активація нейтрофілів (підтвердження їх фагоцитувальної активності), однак надалі їх фізіологічна активність все більше пригнічується, що відповідно проявляється в зниженні рівня фагоцитувальної активності та активності пероксидазних систем. Тобто, це свідчить про наявність важкого поширеного запального процесу, якому сприяють різні агресивні чинники (збудник, токсин, виділення чинників запального процесу — гістаміну, серотоніну і т.ін.), що є при дифтерії, в тому числі і цитокіни. Описана вище "збуджена" картина крові прямо корелює з рівнями цитокінів в плазмі —  $IL-1\beta$ ,  $INF-\alpha$  та  $TNF-\alpha$ , які відіграють виключно важливу роль у регуляції місцевої та системної загальнозапальної реакції, зокрема її лімфоїдної складової, що реалізує специфічну імунну відповідь на антиген будь-якої природи. Результати визначення стану цитокінової системи у периферійній крові хворих на дифтерію, враховуючи тяжкість перебігу, наведені у таблиці 4.

**Таблиця 4**  
Показники цитокінів периферійної крові хворих на дифтерію, враховуючи тяжкість перебігу, та групи контролю

Групи обстежених	Показники цитокінів (пкг/мл)		
	$INF-\alpha$	$TNF-\alpha$	$IL-1\beta$
Легкий (n=6)	259,3 ± 18,2	432,5 ± 10,3 *	232,0 ± 11,6*
Середньотяжкий (n=8)	356,0 ± 30,0***	469,4 ± 15,1***	218,6 ± 17,9*
Тяжкий (n=7)	363,5 ± 24,6 ***	456,0 ± 13,8**	189,7 ± 10,8
Контроль (n=10)	206,0 ± 32,0	325,0 ± 41,0	161,0 ± 22,0

\* $p < 0,05$  — вірогідність відмінності показників досліджуваних груп від контролю;

\*\* $p < 0,01$  — вірогідність відмінності показників досліджуваних груп від контролю;

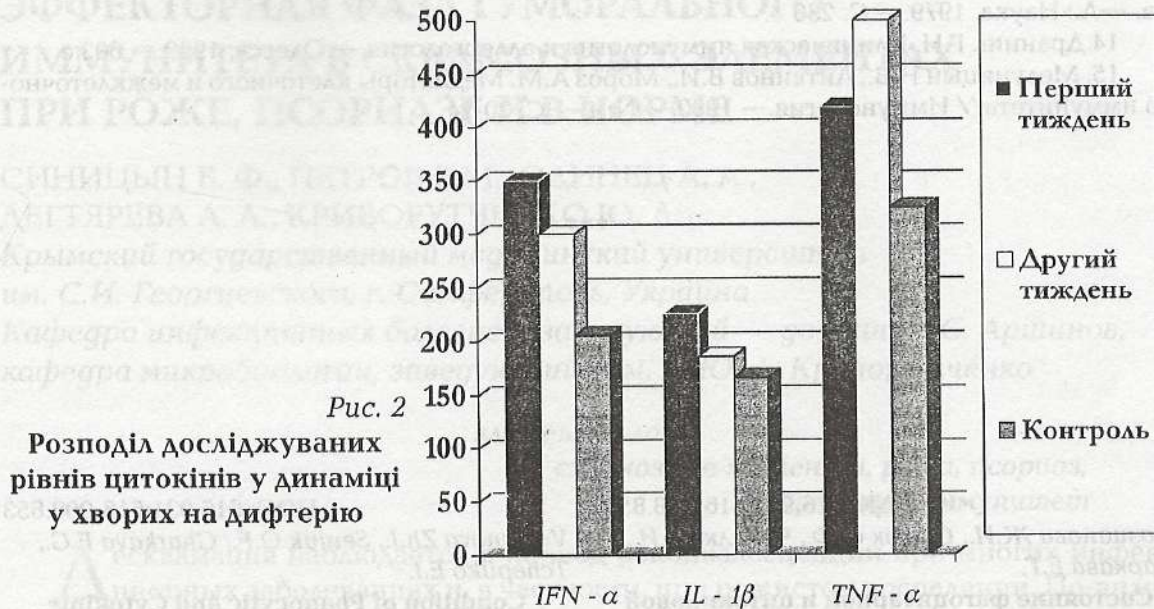
\*\*\* $p < 0,001$  — вірогідність відмінності показників досліджуваних груп від контролю;

Показники (табл. 4)  $INF-\alpha$  збільшувалися відповідно до тяжкості дифтерійного процесу та були достовірними ( $p < 0,05$ ) при середньотяжкому та тяжкому пе-



ребігу. А показники  $IL-1\beta$ , навпаки, зменшувалися до тяжкого перебігу, різниця вірогідна ( $p < 0,05$ ) при легкому та середньотяжкому перебігу. Показники  $TNF-\alpha$  були практично однаковими, вірогідність у всіх випадках достовірна ( $p < 0,05$ ), порівнюючи з контролем. Найбільшим цей показник виявився при середньотяжкому перебігу.

Відповідні показники рівнів цитокінів в плазмі крові в динаміці (перший та другий тиждень захворювання) показано на рисунку 2.



Відповідні цитокіни є прозапальними і їх зростання в сироватці крові вказує на активацію запального процесу, який надалі може призвести до дисбалансу в роботі імунної системи. Спектр інтерлейкінів має хвилову залежність від тяжкості захворювання та його тривалості. Така розбалансована цитокінова система при дифтерії, можливо, є тим поштовхом до більш тяжкого перебігу та виникнення різних ускладнень.

Таким чином, отримані дані свідчать про раннє та активне включення в боротьбу з інфекційними агентами при дифтерії чинників неспецифічної резистентності. Існуюча кореляція при цьому між тяжкістю перебігу та досліджуваними показниками може бути використана вже на ранніх етапах для більш точної оцінки тяжкості і прогнозу перебігу захворювання. Не виключено, що також вже на ранніх етапах в дію вступають гіперергічні реакції (на користь цього говорять показники цитокінів), що необхідно враховувати при призначенні лікування.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Вяльба Е.В., Астафьева Н.В., Быкова Р.Н., Воробьев А.С. // Особенности дифтерии у взрослых на современном этапе // ЖМЭИ.— 1997.— № 4.— С. 28-30.
2. Возианова Ж. И. Дифтерия: современные аспекты // Лікування та діагностика.— 1996.— №3.— С. 18-15.
3. Мостюк А.І., Марієвський В.Ф., Прокопів О.В. Дифтерія.— Львів: Світ, 1996.— 204 с.
4. Турьянов М.Х., Русакова Е.В., Кашляева Т.К., Иванова С.К. Особенности этиологии, эпидемиологии и клиники дифтерии у взрослых на современном этапе // Сов. мед.— 1991.— № 1.— С. 75-77.
5. Медуницын Н.В. Антиинфекционный иммунитет, вакцинация и антигены гистосовместимости // ЖМЭИ.— 1990.— №8.— С. 107-112.
6. Медуницын Н.В., Неприна П.С., Голшмидт В.К. // Бюл. exper. биолог.— 1972.— №8.— С. 70-72.
7. Цыганенко А.Я., Козько В.Н., Чуйков Л.И. Дифтерия у взрослых // Методические указания для студентов 4-6 курсов всех факультетов, субординаторов и врачей-интернов. Харьковський медінститут.— 1992.
8. Бережнова И.А., Зрячкин Н.И., Елисеев Ю.Ю. и др. Новые критерии оценки тяжести эндотоксикоза у больных дифтерией // Журнал эпидемиология и инф. б-ни.— 1998.— № 2.— С. 33-35.



9. Шанина Л.Н. Аутоимунные реакции при чумном и холерном вакцинальном и инфекционном процессах и методы их коррекции. : Автореф. дис. д-ра мед. наук. — Саратов, 1985.
10. Крылова М.Ф. Дифтерия : Учеб. пособие.— Воронеж, 1995.
11. Мельникова А.В. Гуморальные факторы иммунной защиты и иммунорегуляции при различных клинических формах дифтерии у детей // Автореф. дисс... канд. биол. наук.— М., 1997.— 28 с.
12. Земсков В.М. Фагоцитоз : физиологические и молекулярные аспекты // Успехи соврем. биологии.— 1984.— №5.— Т. 98.— С. 219-239.
13. Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., Зарицкий А.Ю. и др. Физиология лейкоцитов человека. —Л.: Наука, 1979.— С. 230
14. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология.— Одесса, 1999.— 603 с.
15. Медуницын Н.В., Литвинов В.И., Мороз А.М. Медиаторы клеточного и межклеточного иммунитета// Иммунология.— 1980.— № 4.— С. 20-24.

УДК: 616.931:616-008.853

Возианова Ж.И., Сениук О.Ф., Чепилко Е.И.,  
Гаркава Е.Г.

#### Состояние фагоцитарной и цитокиновой систем при дифтерии

Целью работы было изучение уровня нарушений факторов неспецифической резистентности у больных дифтерией при разной степени тяжести, что позволит прогнозировать возможность развития различных осложнений.

Установлено, что на первой неделе заболевания показатели нейтрофилов и моноцитов в спонтанном и индуцированном тесте повышались от легкого до тяжелого течения и были достоверны ( $p < 0,05$ ) с контролем. На второй неделе соответствующие показатели (спонтанный и индуцированный тест) продолжали повышаться при легком и уменьшаться при среднетяжелом и тяжелом течении, сравнивая с первой неделей. Определение среднего цитохимического коэффициента пероксидазных систем выявило снижение функции фагоцитирующих клеток в ходе дифтерийного процесса и, возможно, персистенции чужеродных агентов в них.

Увеличение уровней цитокинов в плазме крови в динамике (1 и 2 недели) указывает на активацию воспалительного процесса, который может привести к дисбалансу в работе иммунной системы. Спектр цитокинов имеет волнообразную зависимость от тяжести течения дифтерии, что может быть толчком к более тяжелому течению и развитию осложнений.

UDC: 616.931:616-008.853

Vozianova Zh.I., Seniuk O.F., Gharkava E.G.,  
Tchepilko E.I.

#### Condition of Phagocytic and Cytokinic Systems during Diphtheria

The purpose for this work was studying the abnormalities level for nonspecific resistance factors for diphtheria cases with different severity degrees. This will allow prognosing development of various complications.

It's determined that neutrophil and monocyte indices in spontaneous and induced tests grew from slight to severe clinical course ( $p < 0,05$ ) during the first week. During the second week appropriate indices (spontaneous and induced tests) continued rising if slight and going down if mean severity of clinical course. Defining of mean cytochemical coefficient for peroxidase systems discovered decreasing of phagocytes function during the diphtheria process and possibly persistence of foreign agents in them.

Increasing of cytokine level in blood plasma in dynamics (1st and 2nd weeks) indicates the activation of an inflammatory process which can result in imbalance of immune system functioning. Cytokines spectrum has an indulating dependence on severity level of the clinical course and can be an impulse for even more severe clinical course and complications' development.