

О.Ф. МЕЛЬНИКОВ, Д.Д. ЗАБОЛОТНАЯ

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОБИОТИКОВ НА КЛЕТКИ НЕБНЫХ МИНДАЛИН У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ТОНЗИЛЛИТОМ IN VITRO

*Ин-т отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко АМН Украины
(дир. – чл.-кор. АМНУ, проф. Д.И. Заболотный)*

Развитие медицинской биотехнологии позволило получить новые виды пробиотиков, в связи с чем становится актуальным изучение их иммуномодулирующих свойств как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Имеются сообщения об активном влиянии лактобацилл и термофильных стафилококков на продукцию цитокинов (Muscetolla et al., 1994; Aauttoori, Lemonier, 1997), активность фагоцитов и естественных киллерных клеток (Shiffrin et al., 1997; Meydani, Ha, 2000), местный и системный антителообразующий потенциал (Link-Amaster et al., 1994; Isolauri et al., 2001). Появились отдельные публикации, касающиеся успешного местного использования пробиотиков в комплексной терапии лиц с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей (А.Г. Огнева, 2003; Д.И. Заболотный и соавт., 2003; С.А. Левицька, 2005). В связи с этим представляется необходимым исследовать действие лактобацилл на структуры верхних дыхательных путей, прежде всего лимфоэпителиальные образования глоточного кольца, которые принимают активное участие в формировании мукозальной защиты (Д.И. Заболотный, О.Ф. Мельников, 1999; В.П. Быкова, 1995; О.Ф. Мельников, Д.И. Заболотный, 2003).

В настоящем сообщении представлены данные о влиянии новых форм препаратов на основе лактобацилл на фенотип и функциональную активность некоторых клеток небных миндалин у больных хроническим тонзиллитом.

Материал и методы исследований

Использованы клетки небных миндалин при хроническом тонзиллите у 12 паци-

ентов, которым по показаниям была произведена тонзиллэктомия. Клетки получались механически, согласно рекомендациям О.Ф. Мельникова (1981), и взвешивались в среде RPMI-1640 с добавками (L-глутамин – 290 мкг/мл, эмбриональная телячья сыворотка – до 2,5%, ципринол – 50 мкг/мл). В каждой пробе было взято 2 млн. клеток с уровнем жизнеспособности не ниже 95% от исходной.

Применялись пробиотические препараты на основе штаммов *Lactobacillus murinus* и *Lactobacillus rhamnosus*, которые выделены и селекционированы на кафедре промышленной биотехнологии и биотехники НТУ «КПИ», депонированы в депозитории Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Изучались препараты из лиофильновысушенных клеток лактобактерий штаммов *Lactob. mutinus* (LE) в исходной концентрации $5 \cdot 10^9$ кл/дозе и *Lactob. rhamnosus* (LB3) в той же дозировке. Лактобациллы культивировались вместе с клетками миндалин в течение 2 ч, и затем проводилось тестирование фенотипических и функциональных свойств клеток небных миндалин по следующим показателям:

- изменению числа клеток с рецептором к Fc-фрагменту иммуноглобулинов (розеточный метод, В.П. Лесков и соавт., 1991);

- выявлению до и после инкубации с лактобациллами числа клеток с поверхностными антигенами CD (Л.В. Ковальчук, 2003): CD₂₅ (активированные клетки), CD₅₆ (естественные цитотоксические клетки). Применялся розеточный метод с формализованными эритроцитами, на которых сорбировались моноклональные антитела к

указанным поверхностным антигенам (Витебск, Беларусь);

- отклонению в составе смешанной клеточной популяции числа клеток IgA-продуцентов по уровню люминесценции (непрямой метод Coons, Kubitza, 1968; реактивы Calbiochem, Швейцария);

- активности естественных цитотоксических клеток (ЕЦК) нёбных миндалин против ксеноэритроцитов (спектрофотометрический метод, О.Ф. Мельников, Т.А. Заяц, 1999).

Результаты исследований обработаны статистически с использованием метода углового преобразования по Фишеру (Е.В. Гублер, 1978).

Результаты исследований и их анализ

При изучении влияния препаратов лактобацилл на фенотипические антигены клеток миндалин было показано, что препарат

LD₃ увеличивал число клеток с фенотипом активации клеток и не влиял на число клеток с фенотипом ЕЦК (табл. 1). Препарат LE увеличивал число клеток как с поверхностными антигенами CD₂₅, так и CD₅₆ (активированных клеток и ЕЦК). Оба препарата незначительно стимулировали число клеток с рецептором к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, а препарат LB₃, кроме того, увеличивал число клеток, продуцирующих иммуноглобулин класса А (рис. 1). Оба препарата достоверно усиливали функциональную активность ЕЦК нёбных миндалин (рис. 2).

Для сравнения действия лактобацилл различного происхождения были выполнены исследования по изучению влияния на активность ЕЦК микроорганизмов, содержащихся в препарате канадского йогурта. Было установлено, что препарат не влиял в аналогичных условиях проведения эксперимента на активность ЕЦК нёбных миндалин (таблица 2).

Таблица 1

Содержание клеток с антигенами CD₂₅ и CD₅₆ во взвеси клеток нёбных миндалин до и после контакта с различными лактобациллами

Группы	Число CD ₂₅ ⁺ клеток, %		Число CD ₅₆ ⁺ клеток, %	
	среднее	мин.- макс.	среднее	мин.-макс.
Контроль (n=10)	12,3	3-17	15,2	6-30
LB ₃ (n=9)	17,4	6-30	16,1	7-28
LE (n=9)	23,4*	8-50	21,7*	10-35

Примеч.: * - статистически достоверно по отношению к контролю (p < 0,05)

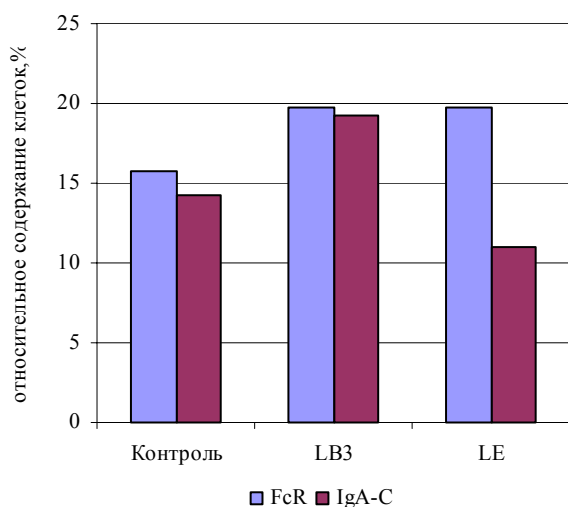


Рис. 1 Содержание во взвеси клеток нёбных миндалин клеток с рецептором к Fc-фрагменту иммуноглобулинов (FcR) и клеток-антителопродуцентов класса А (IgA-C)

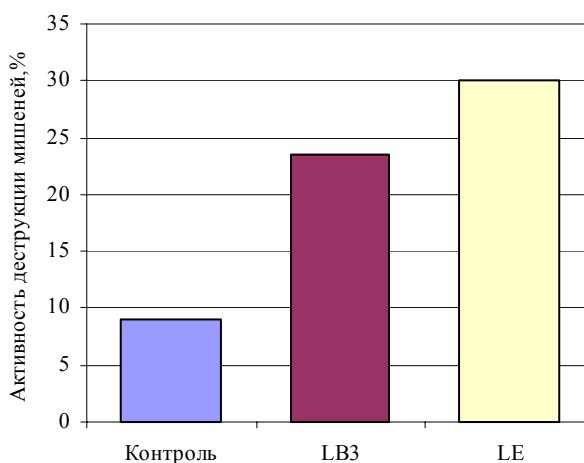


Рис. 2 Влияние различных лактобацилл на цитолитическую активность клеток нёбных миндалин у больных хроническим тонзиллитом in vitro

Таблица 2

Сравнение иммуномодулирующих свойств различных пробиотических препаратов в отношении активности ЕЦК нёбных миндалин

Группы	Активность ЕЦК	
	среднее	мин.- макс.
Контроль (n=10)	8,7	6-20
LB ₃ (n=9)	23,5*	6-75
LE (n=9)	30,1*	8-100
Канадский йогурт (n=7)	11,5	6-17

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что пробиотические препараты, содержащие лактобациллы, могут выступать в роли иммуномодуляторов широкого спектра, и подтверждают данные исследователей об активном их влиянии на формирование гуморальных и клеточных реакций иммунитета (Erickson, Hubard, 2000; Isolauri et al., 2001). Нами с помощью определения влияния указанных препаратов лактобацилл на реакции гуморального и клеточного типа у животных *in vivo* (Д.И. Заболотный и соавт., 2006) было показано,

что представленные новые пробиотические препараты по активности иммуномодуляции не только не уступают известным, но и обладают определенным селективным действием в отношении реакций иммунитета. Так, LB₃ в большей степени активировал реакции гуморального иммунитета, тогда как LE – преимущественно реакции клеточного типа. Выполненные исследования *in vitro* в целом подтверждают эти данные и дополняют их в той части, что оба препарата обладают активирующим влиянием на широкий спектр иммунокомпетентных клеток нёбных миндалин (CD₂₅), а также в том, что препарат LB₃ в условиях прямого контакта с клетками-эффекторами способен усиливать активность ЕЦК, по всей вероятности, не за счет клеток с фенотипом CD₅₆. Что касается механизмов влияния лактобацилл на иммунокомпетентные клетки миндалин, то предполагается (Bourlioux et al., 2003), что в этом процессе могут участвовать как продукты распада и жизнедеятельности микроорганизмов, так и некоторые антигены с их поверхности, однако ответ на этот вопрос требует отдельных исследований.

1. Быкова В.П. Лимфоэпителиальные органы в системе местного иммунитета слизистых оболочек // Арх. патол. – 1995. – №1. – С. 11-16.
2. Гублер Е.В. Математические методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 294 с.
3. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф. Теоретические аспекты генеза и терапии хронического тонзиллита. – К.: Здоров'я, 1999. – 145 с.
4. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф., Заболотная Д.Д., Шинкаренко Л.Н. Модуляция иммуногенеза пробиотиками в эксперименте // Имунологія & алергологія. – 2006. – №2. – С. 19-20.
5. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф., Волосевич Л.И., Зарицька І.С., Голобородько О.П., Карпенко Г.Ф., Вольська О.Г., Волощук М.І., Заболотна Д.Д. Застосування пробіотичного препарату "Ацидолор" у хворих на хронічний тонзиліт та оцінка його ефективності // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2003. – №5. – С. 2-9.
6. Ковальчук Л.В. Антигенные маркеры клеток иммунной системы человека CD. – РГМУ. – М., 2003. – 75 с.
7. Левицька С.А. Мікробіологічні та клінічні аспекти стафілококового бактеріоносійства у дітей, хворих на хронічний синусит та аденоїдні вегетації // Матеріали Х з'їзду отоларингологів України. – г. Київ, 2005. – С. 122-123.
8. Лесков В.П., Халтаян Н.А., Гушин И.С., Структура и функции рецептора для Fc-фрагмента иммуноглобулина // Имунологія. – 1981. – №1. – С. 17-26.
9. Мельников О.Ф. Имунологические аспекты генеза хронического тонзиллита и регуляции функциональной активности нёбных миндалин: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. – Киев: Институт физиологии АН УССР, 1981. – 294 с.
10. Мельников О.Ф., Заболотный Д.И. Диагностика иммунодефицитов при патологии слизистой оболочки на основе определения иммуноглобулинов в секретах (новая концепция). – Институт отоларингологии им. проф. А.И. Ко-

- ломийченко АМН України. – Киев, 2003. – 30 с.
11. Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнение радиоизотопного и спектрофотометрического методов регистрации цитолиза // Лаб. диагностика. – 1999. – №3. – С. 43-45.
 12. Огнева А.Г. Клінічна ефективність фотохромної антисептики і пробіотиків у комплексі лікування хворих на хронічний гнійний верхньощелепний синусит: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Київ, 2003.
 13. Aattouri N., Lemonier D., Production of interferon induced by *Str. termophilus*: role of CD4 & CD8 lymphocytes // Nutr. Biochem. – 1997. – №8. – P. 25-31.
 14. Bourlioux P., Kjetzko B., Guarner F., Braesco V. The intestine & its microflora are partners for the protection of the host // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – b.78. – P. 675-678.
 15. Ericson K.I., Hubbard N.E. Probiotic immunomodulation in health & diseases // J. Nutr. – 2000. – 130 (suppl). – S. 430-439.
 16. Isolauri E., Sutas E., Kankaanpää P., Asrivilommi H., Salminen S. Probiotics: effects on immunity // Am. J. Clin. Nutr. – 2001. – 73 (suppl). – P. 440-450.
 17. Link-Amster H., Rocha F., Saudan K., Mignot O., Aeschliman A.M. Modulation of specific immune response & changes of intestinal flora mediated through fermented milk intakes // FEMS Immunol. MED Microbiol. – 1994. – V. 10. – P. 55-64.
 18. Meydani S., Ha W. Immunologic effects of yogurt // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – V.71. – P. 861-872.
 19. Muscetolla M., Massai M., Tanganelli C., Grasso G. Effect of lactobacilli on interferon production // Ann. N-Y Acad. Sci. – 1994. – V. 717. – P. 226-232.
 20. Schiffrin E.J., Brassart D., Servin A.L. Immune modulation of blood in humans by lactic acid bacteria // Am. J. Clin. Nutr. – 1997. – 66 (suppl). – P. 515-520.

Поступила в редакцію 15.06.06.

© О.Ф. Мельников, Д.Д. Заболотная, 2006

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПРОБІОТИКІВ НА КЛІТИНИ ПІДНЕБІННИХ МИГДАЛИКІВ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ТОНЗИЛІТ IN VITRO

Мельников О.Ф., Заболотна Д.Д. (Київ)

Резюме

Досліджувався вплив нових пробіотичних препаратів на основі лактобацил на функціональну та фенотипову характеристику клітин піднебінних мигдаликів у хворих на хронічний тонзиліт in vitro. Визначався вміст клітин з поверхневими антигенами CD₂₅ та CD₅₆, число клітин IgA-антитілопродуцентів, клітин з рецептором до Fc-фрагменту імуноглобуліну. Виявлено, що досліджувані пробіотичні препарати здатні впливати на фенотипову характеристику клітин мигдаликів і посилювати їх цитотоксичний потенціал.

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF PROBIOTICS INFLUENCE ON THE PALATE TONSILS CELLS IN PATIENTS WITH CHRONIC TONSILLITIS IN VITRO

Mel'nikov O.F., Zabolotna D.D. (Kiev)

Summary

The influence of the new probiotic medicines on the lactobacillus basis on the functional and phenotype palate tonsils cells characteristics in patients with chronic tonsillitis in vitro. There was investigated the cells with surface antigen CD₂₅ and CD₅₆ concentration, the cells IgA-antibody producers quantity, the cells with receptor to the Fc-immunoglobulin fragment. It is revealed, that the investigated probiotic medicines can influence on the phenotype characteristic of the tonsils cells and intensify their cytotoxic potential.