

*О.Ф. МЕЛЬНИКОВ, С.В. ТИМЧЕНКО, Т.Ю. ПАНЧЕНКО, Т.Ю. ВАСИЛЕНКО,
Э.А. МУРЗИНА, М.Д. ТИМЧЕНКО*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ IN VITRO ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГРУПП К ИММУНОМОДУЛЯТОРАМ У БОЛЬНЫХ НАРУЖНЫМ ОТИТОМ

*ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко НАМН Украины»
(дир. – акад. НАМН Украины, проф. Д.И. Заболотный)*

Ранее нами было изучено состояние местного (ушная сера) и системного (клетки и сыворотка периферической крови) иммунитета у больных рецидивирующим наружным отитом (инфильтративная форма) для сравнения с аналогичными показателями у пациентов с рецидивирующим фурункулезом кожи области головы и у практически здоровых доноров. Было установлено, что более частые рецидивы болезни наблюдаются у лиц, имеющих вне стадии её обострения повышенное содержание в сыворотке крови антител к микробным антигенам, высокую концентрацию IgM, сниженный уровень фагоцитарной активности клеток крови и уменьшенное содержание интерферонов как в сыворотке крови, так и в ушной сере. Полученные данные могут быть использованы в качестве критериев определения состояния воспалительного процесса в наружном ухе и являются основанием для проведения профилактической терапии данного заболевания с использованием иммунокорректоров. Из значительного количества иммуностропных препаратов различного происхождения достаточно сложно применить тот или иной модулятор ориентируясь только на предписание изготовителей лекарственного средства.

В настоящее время одним из эффективных способов подбора того или иного модулятора для целей иммунокоррекции в клинике принято считать различные пробы *in vitro*. Значительное число исследователей для выбора эффективного средства основывалось на определении увеличения числа клеток с рецептором к эритроцитам барана (CD2) при культивировании лимфоцитов крови или клеток из лимфоидной ткани с различными концентрациями препарата [11, 16].

Другие авторы базировались на изучении числа бластных клеток в культуре под действием препаратов [10, 17], третьи отдавали предпо-

чтение функциональным тестам, например, усилению цитолитической активности клеток в отношении различных мишеней под действием препарата [1, 9] либо стимуляции фагоцитарной активности клеток крови [13]. Особенно адекватным проведение таких тестов считалось в онкологии и при вирусных инфекциях. При вирусных инфекциях, кроме того, существенное значение стали придавать продукции под действием препаратов различных цитокинов и, прежде всего, интерферонов [4, 12].

В последнее десятилетие влияние иммуностропных препаратов оценивалось по изменению показателя лейкоцитарных антигенов на лейкоцитах, определяющих их функциональную принадлежность по CD [8, 15]. Целью данной работы было изучение влияния различных иммуномодуляторов на основные параметры иммунитета у больных рецидивирующим наружным отитом.

Материал и методы

В связи с изложенным для ориентировочной оценки выбора оптимального препарата при лечении больных наружным отитом (НО) использованы следующие методики:

- определение числа клеток периферической крови у больных с кластерами дифференциации CD2 Т-лимфоциты), CD14 (моноциты); CD56 (большие гранулярные лимфоциты), CD25 (активированные клетки) до и после инкубации *in vitro* с различными препаратами (метод моноклональных антител с образованием розеток [14];
- исследование активности ЕЦК-клеток крови у пациентов в отношении эритроцитарных мишеней при инкубации с различными иммуномодуляторами [1];
- изучение фагоцитарной активности проводилось по фагоцитарному числу, т.е. ко-

личеству частиц латекса, поглощенных одним фагоцитом периферической крови. При этом придерживались рекомендаций И.П. Кайдашева [6];

– определение продукции цитокинов (α - и γ -интерферонов) в аналогичных условиях. При этом использовались нестимулированные митогеном культуры клеток крови больных в период клинической ремиссии [12]. Из иммуномодуляторов были апробированы следующие:

- 1) тимоген – 0,01% раствор синтетического тимомиметика производства «Днепрофарм» (Украина);
- 2) эхинацея композитум – раствор в ампулах, производства компании «Heel» (Германия);
- 3) полиоксидоний – порошок во флаконах для приготовления растворов, НПО «Петроваксфарм» (Россия);
- 4) биоферон – рекомбинантный 2β -интерферон, по 3 млн. ед. во флаконе, «Pharma science» (Аргентина);
- 5) тиотриазолин (капли в нос) – «Галичфарм», «Фарматрон» Украина.

Препараты (за исключением биоферона и эхинацеи) использовались в концентрациях 5 мкг на 1 мл питательной среды, содержащей 1 млн мононуклеаров. Биоферон применялся в концентрации 10000 ед. на 1 мл. среды, эхинацея – 1:100 в конечной концентрации от исходной. Время инкубации – 1 ч, после чего взвеси клеток отмывались от препаратов и проводилось тестирование через 18 ч нахождения в условиях термостата (37°C). Центрифугировалась и отдельно исследовалась надосадочная жидкость (продукция цитокинов) и клеточное содержимое осадка.

По каждому виду тестирования было поставлено 20 проб с дублирующим вариантом в каждом опыте и последующим расчетом средних значений, а также уровня частотного отклонения – усиление числа и активности клеток, отсутствие каких-либо изменений, депрессорное влияние иммуномодуляторов. Статистическая обработка выполнена с применением параметрического критерия «t» Стьюдента [3].

Результаты исследований и их анализ

Результаты определения CD2, CD14 и CB56 клеток до и после инкубации с препаратами представлены в табл. 1.

Как следует из данных этой таблицы, у больных НО достоверно снижено по сравнению с контролем содержание Т-лимфоцитов (CD2) и CD14 (моноциты). Инкубация в течение 1 ч с различными препаратами приводила к достоверной стимуляции числа этих клеток под влиянием эхинацеи, тимогена и полиокси-

дония, однако вектор в сторону стимуляции был выявлен при воздействии всех исследованных иммуномодуляторов.

Дальнейшие исследования касались функциональной активности клеток врожденного иммунитета-фагоцитирующих клеток крови и естественных цитотоксических клеток (ЕЦК).

Изучение уровня естественной цитотоксичности клеток крови больных НО и практически здоровых доноров при действии препаратов *in vitro* и без них представлено в табл. 2.

Данные таблицы свидетельствуют о том, что изменение активности ЕЦК под действием препаратов наблюдалось только у больных НО, у которых деструктивная активность ЕЦК была ниже, чем у здоровых доноров. Используемые иммуномодуляторы практически не изменяли эту активность у здоровых и в большинстве своем стимулировали ее у больных НО. Это свидетельствует о дефицитности активирующих стимулов у пациентов с рецидивирующим наружным отитом. Достоверно стимулировали активность ЕЦК следующие препараты: тимоген (36,5%), биоферон (42,5%) и полиоксидоний (56,3%).

Исследование влияния апробированных препаратов на уровень фагоцитарной активности клеток крови у больных (по фагоцитарному числу) в условиях контакта с иммуномодуляторами *in vitro* показало (рис. 1), что при наружном рецидивирующем отите имеет место его снижение в исходном состоянии (2,8 – у больных и 7,5 – у здоровых доноров), свидетельствующее о недостаточной активности системы мононуклеарных фагоцитов [6].

Под действием эхинацеи композитум и полиоксидония отмечалось достоверное увеличение захвата частиц латекса одной фагоцитирующей клеткой (фагоцитарное число). В контроле существенных изменений в уровне фагоцитарной активности под влиянием препаратов выявлено не было.

Увеличение синтеза раннего (α) и позднего (γ) интерферонов было обнаружено в надосадочной жидкости культур мононуклеаров крови у больных НО и здоровых после 30-часовой инкубации с препаратами или без них. На повышение спонтанного синтеза раннего интерферона более активно и достоверно влияли биоферон и полиоксидоний, а на синтез гамма-интерферона оказывали действие практически все препараты (рис. 2). Далее представлены наиболее эффективные препараты в каждом варианте исследований по мере снижения их эффективности.

По CD2-экспрессии: не выявлено; по CD14-экспрессии: эхинацея композитум полиоксидоний; по CD25-экспрессии: тимоген, эхи-

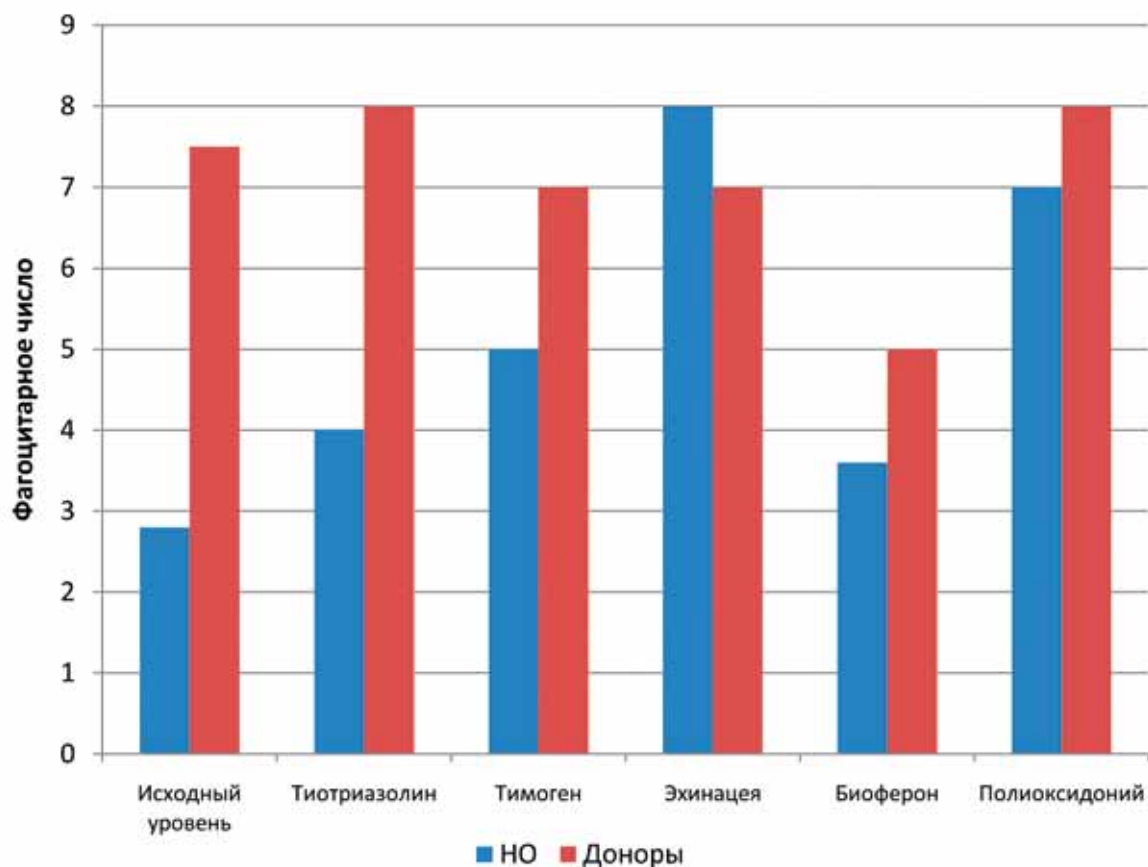


Рис. 1. Влияние иммуномодуляторов на активность фагоцитоза клетками крови у больных НО в условиях *in vitro*.

Таблица 1

Содержание клеток крови с различными кластерами дифференциации у больных НО в культуре <i>in vitro</i> при действии исследуемых иммуномодуляторов				
CD (исходный уровень)	Относительное содержание клеток (%) при действии иммуномодуляторов			
	тимоген	Эхинацея композитум	полиоксидоний	биоферон
CD2 (38,5±11,2)	58,2±5,5*	42,2±11,9	46,6±12,5	39,5±8,1
CD14 (3,2±1,1)	7,3±2,8	8,3±2,5*	11,2±2,5*	6,5±2,2
CD25 (5,8±1,4)	16,5±2,8*	15,5±3,3*	14,3±3,1*	12,6±2,3*
CD56 (5,2±3,2)	4,7±0,9	3,9±0,9	12,6±2,6*	15,4±3,2*

Контрольные доноры:
CD2 – 45,5±10,2; CD14 – 6,8±2,2; CD25 – 10,5±3,3; CD56 – 9,5±2,5

Таблица 2

Эритроцитолизическая активность клеток крови больных НО и здоровых доноров в присутствии различных иммуномодуляторов					
Группы обследуемых	Относительное содержание клеток, %				
	исходный уровень	препараты			
		эхинацея	тимоген	биоферон	полиоксидоний
тиотриазолин					
Здоровые (10)		42,2±4,5 (0-25)	36,2±3,3	50,0±10,0	59,8±11,2
Больные НО (15)	18,5± 3,2*	29,3±3,5	28,2± 5,2	36,5± 6,6*	42,5±8,5*

* - p < 0,05; ** - p < 0,02.

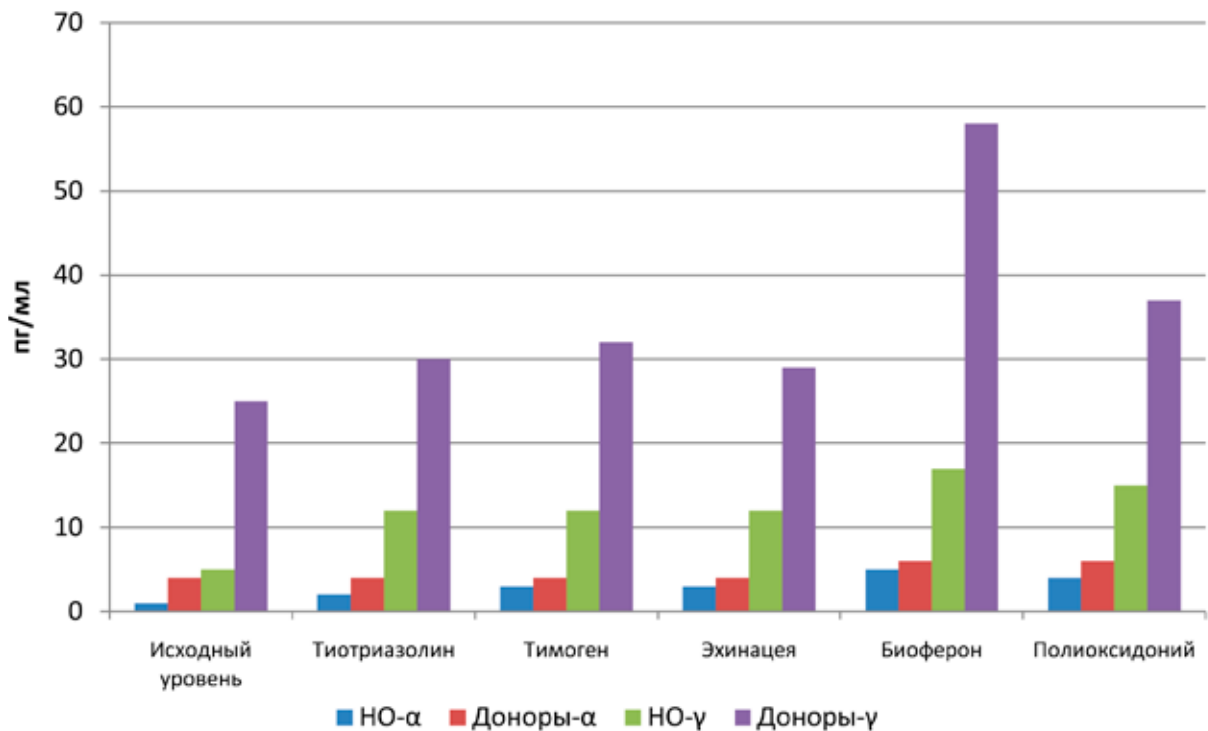


Рис. 2. Влияние различных иммуномодуляторов на синтез клетками крови альфа- и гамма-интерферонов *in vitro* у больных НО и здоровых доноров

наея; CD56-экспрессии: гропринозин, дибазол тиотриазолин, тимогениммунофан.

ЕЦК-активность: полиоксидоний, биоферон тиотриазолин.

Фагоцитоз: эхинацея композитум – полиоксидоний.

Продукция интерферонов – биоферон полиоксидоний.

Проведение такого набора экспериментальных исследований позволило ориентироваться в выборе препаратов для применения в комплексной терапии больных НО, хотя изучение *in vitro* не всегда соответствует влиянию препаратов в условиях *in vivo* [2]. Наряду

с этим, значительный клинико-иммунологический опыт тестирования препаратов в витральном варианте и последующего использования наиболее эффективных из них в условиях клиники, в том числе при воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей и уха, свидетельствует о целесообразности такого подхода [5, 7, 9, 17]. По сумме положительных влияний как на экспрессию различных антигенов, так и на нормализацию функций иммунокомпетентных клеток крови у больных рецидивирующим наружным отитом наиболее эффективными препаратами являются полиоксидоний, эхинацея композитум и тимоген.

1. Бережная Н.М. Иммунологические исследования в клинике: состояние вопроса // Иммунология (М). – 2006. – т.27, №1. – С.18-22.
2. Гублер Е.В. Математические методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 294с.
3. Ершов Ф.И., Норовлянский А.Н., Мезенцева М.В. Ранние цитокиновые реакции при вирусных инфекциях // Цитокины и воспаление. – 2004. – т.3, №1. – С.3-6.
4. Заболотна Д.Д. Клініко-імунологічні особливості діагностики та лікування хворих на хро-

- нічний риніт при патології піднебінних мигдаликів: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / 14.01.19. (Інститут отоларингології АМН України). – Київ, 2002. – 20 с.
5. Кайдашев І.П. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. – Полтава: Полімет, 2003. – 319с.
6. Кобицький М.М. Лікування хворих на хронічний катаральний риніт з використанням нестероїдного протизапального препарату та імуномодуляторів: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.19 / Інститут отоларингології АМН України. – Київ, 2005. – 15 с.

7. Ковальчук Л.В. Антипенные маркеры иммунной системы человека CD. – Москва: РГМУ, 2003. – 76.
8. Красий Р.И. Клинико-экспериментальное обоснование применения новых иммуномодуляторов типа фенилимидазотиазола у больных раком гортани: Автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.00.04. Киевский НИИ отоларингологии МЗ УССР). – Киев, 1989. – 155 с.
9. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунологическая недостаточность. – Новгород; НГМА, 2003. – С.361-362.
10. Мельников О.Ф., Красий Р.И. Гюллинг Э.В. Способ определения чувствительности организма к иммуностимуляторам при лечении онкологических больных. – Авт. св. СССР №1246450 от 29 марта 1985 г.
11. Мельников О.Ф., Рьльская О.Г. Экспериментальное исследование иммуномодулирующих свойств Тонзилгона Н in vitro // Журн. ушных, носовых и горловых болезней. – 2005. – №3. – С.74-76.
12. Мельников О.Ф., Тимченко М.Д., Кривохатская Л.Д., Мурина Э.А. экспериментальное изучение влияния препарата Септолете + на факторы противовирусного иммунитета In vitro // Журн. ушных, носовых и горловых болезней. – 2010. – №2. – С.29-33.
13. Морозова Н.О. Клініко-патогенетичне обґрунтування профілактики метастазування раку гортані: Автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.01.19. Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України). – Київ, 2002. – 18 с.
14. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Метод определения Т- и В-лимфоцитов диагностикумами на основе моноклональных антител
15. Олейник В.В. Обоснование комбинированной терапии хронического тонзиллита с использованием бактериальных средств и полиоксидония // Матер. наук. праць 10-го з'їзду отоларингологів України. – Судак, 2005. – С.468-469
16. Самбур М.Б. Стан імунної системи та механізмів імунного гомеостазу в умовах дії малих доз іонізуючої радіації Автореф. дис. ... докт. мед. наук. (14.00.36. Киевский медицинский институт). – 1994. – 38 с.
17. Oehling A., Sanz M., Resano A. Значение контроля in vitro для оценки эффективности иммунотерапии // Int. J. Immunorehabilitation (Москва). – 1998. – №10. – С.150-152.

Поступила в редакцию 31.03.2011.

© О.Ф. Мельников, С.В. Тимченко, Т.Ю. Панченко, Т.Ю. Василенко, Э.А. Мурзина, М.Д. Тимченко, 2011

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ
IN VITRO ЧУТЛИВОСТІ РІЗНИХ
ФУНКЦІОНАЛЬНИХ ГРУП КЛІТИН КРОВІ
ДО ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ У ХВОРИХ НА
ЗОВНІШНІЙ ОТИТ**

*Мельников О.Ф., Тимченко С.В., Панченко Т.Ю.,
Василенко Т.Ю., Мурзина Е.А., Тимченко М.Д. (Київ)*

Резюме

Досліджувався вплив імуномодуляторів різної природи – тіотриазоліна, тимогена, біферона, ехінацеї композитум та поліоксидонія на експресію поверхових антигенів CD2, 14, 25, 56 на клітинах крові, їх природну цитолітичну і фагоцитарну активність, здатність до продукції інтерферонів in vitro у хворих на рецидивуючий зовнішній отит в стадії клінічної ремісії. За сумою позитивних впливів як на експресію різних антигенів, так і на нормалізацію функції імунокомпетентних клітин крові у таких пацієнтів найбільш ефективними препаратами виявились поліоксидоній, ехінацея композитум та тимоген, які можуть бути використані в якості провідного компонента протирецидивного лікування у хворих на зовнішній отит.

**CLINICAL-POPULATION ANALYSIS OF
MORBIDITY POLYPOUS RHINOSINUSITIS
RESIDENTS OF KHARKIV AND KHARKIV
REGION**

Lupyr A.V. (Kharkiv)

S u m m a r y

Study t