

*В.П. СЕМЕНЮК, О.Ф. МЕЛЬНИКОВ*

## **ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ГЛОТОЧНОЙ МИНДАЛИНЫ У ДЕТЕЙ IN VITRO**

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

Согласно современной патогенетической концепции развития локальной недостаточности иммунитета в области верхних дыхательных путей [7, 8], заболевания лимфаденоидного глоточного кольца Пирогова-Вальдейера формируются в условиях развития локально-системной иммунологической недостаточности, которая при проведении хирургического вмешательства существенно усугубляется за счет действия стрессовых факторов [9]. Кроме того, выключение глоточной миндалины из состава лимфоидной ткани также может неблагоприятно сказываться на состоянии местного и даже системного иммунитета, как это было отмечено для небных миндалин [2, 14].

Данные отдельных исследований по различным аспектам хирургического вмешательства, в том числе при аденоидите, гипертрофии миндалин, хроническом тонзиллите, свидетельствуют о необходимости проведения иммунореабилитационных мероприятий, существенно снижающих риск возникновения и углубления состояния иммунодефицита, а также возможных послеоперационных осложнений [4]. Исследования в этом направлении указывают на более благоприятное течение послеоперационного периода у больных после тонзиллэктомии, когда в этом периоде применялись современные методы иммунореабилитации [2]. Наряду с этим, вопрос о степени иммунодефицитности клеток глоточной миндалины в условиях ее гипертрофии и при аденоидите окончательно не решен, равно как и определение потенциально наиболее эффективного иммунокорректора по иммунофар-

макологическому тестированию препаратов в условиях *in vitro* [1, 2, 13]. В связи с изложенным представлялось целесообразным изучить состояние клеток глоточной миндалины у детей с её гипертрофией до и после влияния на клетки миндалин различных иммуномодуляторов.

### ***Материал и методы***

Исследования проведены на клетках глоточных миндалин у 23 детей, которым по показаниям (гипертрофия II-III степени) была произведена аденэктомия. Клетки миндалин были получены механически в стерильных условиях, как это описано О.Ф. Мельниковым, О.Г. Рыльской [11]). Клетки взвешивались в среде 199 (Пан Эко, Москва, РФ) с добавками: 100-кратный концентрат незаменимых аминокислот и витаминов 5% эмбриональной сыворотки теленка (все реактивы Serva, ФРГ); ципринол – 40 мкг/мл (КРКА, Словения).

В качестве иммуномодуляторов использовались тималин (РФ), препарат эхинацеи композитум С (Heel, ФРГ), синупрет (Бионорика, ФРГ), полиоксидоний (РФ). Все препараты добавлялись по 10 мкг на пробу (1 млн. клеток), инкубировались в течение 36 часов в стерильных флаконах (Sprektar), после чего клетки отделялись от жидкости и исследовались оба компонента. Контролем служили образцы культивируемых клеток и надосадочная жидкость без препаратов.

Фенотипические характеристики включали определение поверхностных антигенов CD3, CD14, CD20, CD25, CD56

методом розеткообразования с консервированными ксеноэритроцитами, покрытыми моноклональными антителами [12]. Функциональная активность клеток оценивается по уровню активности естественных цитотоксических клеток (ЕЦК) против эритроцитов цыплят [10], фагоцитарному показателю-ФП (число фагоцитирующих клеток) и фагоцитарному индексу-ФИ (число частиц латекса, поглощенных одним фагоцитом), придерживаясь рекомендаций И.П. Кайдашева [5]. В надосадочной жидкости

методом иммуноферментного анализа определялось содержание альфа-интерферона (реактивы ООО «Цитокин», РФ). Данные исследований обработаны с применением непараметрического критерия U Вилкоксона-Манна-Уитни [3].

### Результаты

Данные по изучению влияния иммуномодуляторов на клетки глоточной миндалины по фенотипическим антигенам представлены в табл. 1.

Таблица 1

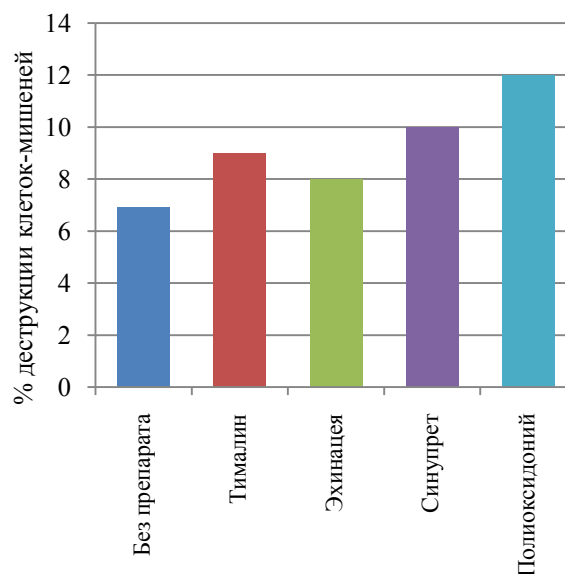
Влияние иммуномодуляторов на количественные характеристики фенотипов клеток глоточной миндалины *in vitro*

Препараты	Поверхностные антигены клеток глоточной миндалины (CD)				
	Относительное содержание клеток, % (M±m)				
	CD <sub>3</sub>	CD <sub>14</sub>	CD <sub>20</sub>	CD <sub>25</sub>	CD <sub>56</sub>
Без препарата	22,5±3,8	3,1±1,2	8,6±3,2	5,0±2,1	3,1±0,7
Тималин	25,5±7,5	4,2±1,4	12,5*± 2,5	10,2±2,2*	5,2±1,2
Эхинацея	27,5±6,6	9,5±3,1*	11,1±2,8	11,2±3,3*	5,5±1,5
Синупрет	25,5±4,5	8,8±2,3*	12,2±3,5	12,8±2,6*	10,2±2,2*
Полиоксидоний	34,8±1,8*	11,2±3,2*	10,5±2,1	12,8±3,3*	9,5±2,5*

Примечание: \* достоверно по отношению к группе «без препарата»  $p < 0,05$

Не выявлено однонаправленного действия препаратов. Так, тималин активировал экспрессию антигенов CD20 (В-лимфоциты) и CD25 (активированные клетки), препарат эхинацеи стимулировал моноцитарные клетки (CD14) и активированные клетки, отмечено стимулирующее влияние синупрета на моноцитарный ряд, естественные цитотоксические клетки (ЕЦК), а полиоксидоний способствовал появлению большего количества клеток со всеми изученными антигенами, за исключением В-лимфоцитов.

На рисунке представлены данные о функциональной активности ЕЦК глоточной миндалины под действием препаратов и подчеркивается, что достоверная стимуляция уровня цитолитической активности клеток выявлена при действии синупрета и полиоксидония.



Активность ЕЦК глоточной миндалины под действием различных иммуномодуляторов *in vitro*.

При определении влияния препаратов на уровень активности фагоцитоза по ФП (число клеток, участвующих в процессах захвата частиц латекса) и по ФИ (число час-

тиц латекса, поглощенных одной фагоцитирующей клеткой) обнаружено активирование полиоксидонием и эхинацеей по показателю ФИ (табл. 2).

Таблица 2

Влияние иммуномодулирующих препаратов на показатели фагоцитарной активности клеток глоточной миндалины при инкубации *in vitro*

Препараты	Фагоцитарный показатель, %		Фагоцитарный индекс	
	СЗ (М)	ПК	СЗ	ПК
Без препарата	40,5	20-58	2,1	1-4
Тималин	44,3	21-55	2,6	1-4
Синупрет	55,2*	27-60	3,6	1-5
Эхинацея	56,6*	30-60	5,0*	3-8
Полиоксидоний	45,5	28-60	3,1	3-5

Примечание: \* достоверно по отношению к исходному уровню «без препарата»

### **Заключение**

Таким образом, различные функциональные группы клеток миндалин стимулировались *in vitro* препаратами с различной

степенью эффективности. Оптимальными по сумме положительных влияний (по мере снижения) являются синупрет, полиоксидоний и препарат эхинацеи комpositум.

### **Литература**

1. Бредун А.Ю. Експериментальне та клінічне обґрунтування застосування комбінації препаратів «Тималін» та «Амізон» для корекції мукозального імунітету при верхньощелепному синуситі у дітей: Автореф. дис.... канд. мед. наук: 14.01.19. – Київ, 2004. – 24 с.
2. Верес В.М. Обґрунтування та апробація імунореабілітації при хірургічному лікуванні хворих на хронічний тонзиліт: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.19 / Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України. – Київ, 2003. – 20 с.
3. Гублер Е.В. Математические методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978. – 294 с.
4. Дидиченко Ю.А. Обґрунтування та клініко-імунологічна оцінка застосування фітопрепарату в комплексному післяопераційному лікуванні хворих на хронічний тонзиліт: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.19/ ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України». – Київ, 2011. – 28 с.
5. Кайдашев І.П. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині. – Полтава: Полімет, 2003. – 319 с.
6. Мельников О.Ф., Заболотний Д.И. Диагностика иммунодефицитов при патологии слизистой оболочки на основе определения иммуноглобулинов в секретах // Концепция диагностики иммунодефицитов при патологических процессах в слизистых оболочках. – Киев, 2003: Изд. Института отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко АМН Украины. – 30 с.
7. Ковальчук Л.В. Антигенные маркеры иммунной системы человека. – М. (учебное пособие). – 2003. – 75 с.
8. Мельников О.Ф., Заболотний Д.І. Новий концептуальний підхід до діагностики імунodefіцитного стану на основі визначення вмісту се-

- креторного імуноглобуліну А при інфекційно-запальних захворюваннях ЛОР-органів // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2002. – № 6. – С. 2-6.
9. Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнительное изучение радиоизотопного и спектрофотометрического метода исследования цитоллиза клеток // Лаб. диагностика. – 1999. – № 5. – С. 43-45.
10. Мельников О.Ф., Рьльская О.Г. Экспериментальное исследование иммуномодулирующих свойств Тонзилгона Н in vitro // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2005. – № 3. – С.74-76.
11. Мельников О.Ф., Заболотный Д.И., Дидиченко Ю.А. Влияние фототерапии Имупретом на уровень стрессорной реакции и содержание цитокинов в крови больных хроническим тонзилитом в послеоперационном периоде // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2008. – № 3-с. – С. 83-84.
12. Новиков Д.К., Новиков П.Д. Метод определения Т и В лимфоцитов диагностикумами на основе моноклональных антител // Иммунология. – 2000. – № 2. – С. 31-33.
13. 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.
14. Чернышова Л.И., Костюк О.П., Волоха А.П. Заместительная терапия иммуноглобулинами первичных иммунодефицитов антителообразования у детей // Иммунология та алергологія. – 1998. – №3. – С. 69-74.

Поступила в редакцию 12.04.15.

© В.П. Семенюк, О.Ф. Мельников, 2015

## ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ФЕНОТИПОВІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛІТИН ГЛОТКОВОГО МИГДАЛИКА У ДІТЕЙ IN VITRO

Семенюк В.П., Мельников О.Ф. (Київ)

### Резюме

Є відомості, що виключення глоткового мигдалика зі складу лімфоїдної тканини і системних імунологічних взаємовідносин може несприятливо позначатися на стані місцевого і навіть системного імунітету, як це було встановлено для піднебінних мигдаликів. Дані окремих досліджень з різних аспектів хірургічного лікування, в тому числі при аденоїдиті, гіпертрофії мигдаликів, хронічному тонзиліті, свідчать про необхідність проведення імунореабілітаційних заходів, які істотно знижують ризик виникнення або поглиблення стану імунодефіциту і можливих післяопераційних ускладнень.

**Метою** роботи було дослідити функціональний стан клітин глоткового мигдалика у дітей з гіпертрофією глоткового мигдалика до та після впливу на клітини мигдаликів різними імуномодуляторами in vitro.

**Матеріал і методи.** Дослідження проведені на клітинах глоткового мигдалика 23 дітей, яким за показаннями (гіпертрофія 2-3 ступеня) була проведена аденектомія. В якості імуномодуляторів використовували тималін (РФ), препарат ехінацеї – композитум С (Heel, ФРН), Синупрет (Біонорика, ФРН), поліоксидоній (РФ). Всі препарати додавали до клітин по 10 мкг на пробу (1 млн. клітин), інкубували протягом 36 год в стерильних флаконах (Spectar), після чого клітини відокремлювали від рідини і досліджували обидва компонента. Контролем служили зразки культивованих клітин і надосадова рідина без препаратів. Фенотипічні характеристики включали визначення поверхневих антигенів CD3, CD14, CD20, CD25, CD56; функціональну активність клітин оцінювали за рівнем активності природних цитотоксичних клітин (ЕЦК) проти еритроцитів курчат, фагоцитарним показником. У надосадовій рідині методом імуноферментного аналізу визначали вміст альфа-інтерферону (реактиви ТОВ «Цитокін», РФ). Дані досліджень оброблені із застосуванням непараметричного критерію U (Вілкоксона-Манна-Уїтні).

**Результати.** Не виявлено односпрямованої дії застосованих препаратів. Тималін активував експресію антигенів CD20 і CD25; препарат ехінацеї стимулював моноцитарні клітини (CD14), синупрет – моноцити і природні цитотоксичні клітини, а поліоксидоній мав полістимулюючу дію.

**Висновок.** Таким чином, різні функціональні групи клітин мигдаликів стимулювалися in vitro препаратами з різним ступенем ефективності. Оптимальними за сумою позитивного впливу (по ступеню зниження) є синупрет, поліоксидоній і препарат ехінацеї – композитум.

**Ключові слова:** глотковий мигдалику, культура in vitro, імуномодулятори, фактори імунітету.

## INFLUENCE OF IMMUNOMODULATORS OF DIFFERENT ORIGIN ON PHENOTYPE AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF PHARYNGEAL TONSILS CELLS IN CHILDREN IN VITRO

*Semeniuk V.P., Melnikov A.F.*

*State institution «O.S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology  
of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; e-mail: amtc@kndio.kiev.ua*

### *Abstract*

There is evidence that exclusion a pharyngeal tonsil from the lymphoid and immune system relationships may interfere with the state of the local and even systemic immunity as it has been proved for the palatinal tonsils. Certain publications on various aspects of surgical treatment, including adenoids, hypertrophy of the tonsils, chronic tonsillitis, indicate the need for immunorehabilitation which significantly reduces the risk of occurrence and deterioration of immune deficiency and possible post-operative complications.

**AIM.** To assess the functional state of the pharyngeal tonsil cells in children with pharyngeal tonsils hypertrophy before and after the exposure to different immunomodulators in vitro.

**Materials and methods.** The study was conducted on pharyngeal tonsil cells of the 23 children with adenoids hypertrophy who undergone adenoidectomy. Timalin (Russian Federation), Echinacea compositum (Heel, Germany), Sinupret (Bionorica, Germany) and Polyoxidonium (Russian Federation) were used as immunomodulators. Samples (1 million cells) after adding 10 µg of each drug were incubated for 36 hours in sterile vials (Spectar), then cells were separated from the liquid and both were analyzed. Cultured cells and the supernatant without drugs were used as control samples.

Phenotypic characterization included the determination of the surface antigens CD3, CD14, CD20, CD25, CD56. Functional activity of the cells was assessed by activity level of cytotoxic cells (ETSK) against chicken erythrocytes and the phagocytic index. Content of alpha-interferon was determined in the supernatant by enzyme immunoassay ("Cytokine Ltd", Russian Federation). Research data were analyzed using the nonparametric U criterion (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

**Results.** There were no one-way action of the studied drugs. Timalin activated antigens CD20 and CD25 expression, Echinacea preparations stimulated monocytic cells (CD14), Sinupret stimulated monocytes and natural cytotoxic cells and Polyoxidonium had multidirectional stimulation action.

**Conclusion.** Different functional groups of tonsillar cells were stimulated in vitro preparations with varying degrees of effectiveness. The optimal amount of positive influences (in descending) had Sinupret, Polyoxidonium and Echinacea compositum medication.

**Keywords:** pharyngeal tonsil, in vitro culture, immunomodulators, immunity factors.