

РЕЗЮМЕ

**КЛЕТКИ Th17 И ИХ РОЛЬ В ВОЗНИКНОВЕНИИ  
АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Дьяченко<sup>1</sup> П.А., А.Г.Дьяченко<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней  
им. Л.В. Громашевского», г. Киев,  
<sup>2</sup>Сумский государственный университет, г. Сумы

Недавно открытый третий клон хелперных Т клеток (Th17) позволяет по-новому взглянуть на механизмы развития аутоиммунных заболеваний и иммунные ответы, необходимые для эффективной противомикробной защиты. Эти клетки отличаются от других клонов CD4+ Т лимфоцитов. Главной особенностью субпопуляции является продукция значительного количества IL-17 и других провоспалительных цитокинов, что определяет ее роль в защите против инфекций, вызванных внеклеточными микроорганизмами и грибами. Однако ответы Th17 могут быть также связаны с вирусной персистенцией и развитием аллергии и аутоиммунных заболеваний. Очевидно, что в процессе эффективного защитного ответа организма на инфекцию поддерживается тонкий баланс между субпопуляциями Т

клеток, который важен для последовательного включения механизмов защиты. Нарушение этого баланса приводит к изменению пропорции и степени активации отдельных клонов Т лимфоцитов и, в итоге, к развитию аутоиммунной патологии.

**Ключевые слова:** Th17 лимфоциты, аутоиммунные заболевания.

**SUMMARY**

**The role of Th17 cells in the pathogenesis of  
autoimmune diseases**

*P.Dyachenko<sup>1</sup>, A. Dyachenko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>State Enterprise «Memory L.V.Gromashevsky Institute of  
epidemiology and infectious diseases of AMS of Ukraine», Kyiv,  
<sup>2</sup>Sumy State University, Sumy

A new subtype of CD4+ T lymphocytes have recently been described, and have provided new insights into the mechanism that are important in the development of autoimmune diseases and the immune responses that are essential for effective antimicrobial host defense.

УДК 612.017:616.151.5:616.523-085

**ПОВЫШЕНИЕ IN VITRO ПОД ВЛИЯНИЕМ ИММУНОМАКСА (АНСС – ACTIVE  
HEXOSE CORRELATED COMPOUND) – ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ  
С ЧАСТО РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ГЕРПЕСОМ HSV-1,2**

(Обзор литературы и собственные данные)

*ДРАННИК Г.Н.<sup>1,2</sup>, КУРЧЕНКО А.И.<sup>2</sup>, САВЧЕНКО В.С.<sup>1</sup>, ФЕДОРУК Г.В.<sup>2</sup>,  
ТАРАСОВА И.И.<sup>1</sup>, ДЕРКАЧ М.И.<sup>2</sup>.*

<sup>1</sup>ГУ «Институт урологии АМН Украины»,

<sup>2</sup>Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

За последние 25 лет фундаментальная иммунология обогатилась новыми знаниями, что значительно расширило понимание механизмов развития иммунозависимых патологий и роли иммунной системы в поддержании гомеостаза организма в самом широком смысле этого понятия. К таким открытиям можно отнести детальное описание системы цитокинов, субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов 1-го и 2-го типов, Т-регуляторных клеток и их роли в поддержании толерантности, важнейших функций дендритных клеток и их Toll-like рецепторов в развитии иммунного ответа и гармонизации врожденного и приобретенного иммунитета, понимание роли естественных киллерных клеток в реализации защитных цитотоксических функций при вирусных и онкологических заболеваниях и, наконец, недавнее открытие Т-хелперов 17 и их роли в иммунопатологии.

Темпы развития в мире фундаментальной и прикладной иммунологии впечатляют; Однако, не менее впечатляющими, к сожалению, выгля-

дят темпы увеличения частоты иммуноаллергопатологий.

По данным ВОЗ распространение иммунодефицитов и аллергических заболеваний увеличивается во всем мире. Количество выявленных первичных генетически детерминированных иммунодефицитов составляет около 1% населения, приобретенных – до 20%. Европейской академией клинической иммунологии и алергологии рассчитано, что в Украине количество детей, пациентов первичными иммунодефицитами может достигать 250 тыс. По подсчетам ВОЗ от 30 до 38% населения Украины может страдать нарушениями иммунной системы. Прогнозируется, что в 2015 году 40% взрослого населения Европы будут страдать аллергией.

Внедрение в клиническую практику иммунотропных препаратов открыло небывалые перспективы в борьбе с раком, аутоиммунными заболеваниями, иммунодефицитными состояниями и другой иммунозависимой патологией.

Хочется отметить, что любые новые знания, полученные в области фундаментальной иммунологии, немедленно внедряются в практическое здравоохранение, будь-то лабораторная диагностика или лечебные препараты. К настоящему времени созданы и продолжают создаваться многочисленные иммуностропные препараты (иммуномодуляторы).

Развитие иммунологии привело к пониманию того, что действие иммуномодуляторов определяется особенностями иммунной системы, а именно, взаимосвязанным и взаимозависимым функционированием клеточных элементов, которые принимают участие в развитии иммунного ответа. Особенно это касается изучения функциональной активности иммунокомпетентных клеток путем анализа их пролиферативной способности и особенно продукции цитокинов, которые играют роль медиаторов, обеспечивающих кооперативное межклеточное взаимодействие.

Из вышеизложенного следует, что изучение *in vitro* и *in vivo* влияния современных иммуностропных препаратов на иммунокомпетентные клетки является одним из ключевых параметров при оценке их эффективности и оптимизации дальнейших терапевтических мероприятий.

В настоящее время наблюдается неуклонный рост числа пациентов с непрерывно рецидивирующими хроническими воспалительными заболеваниями, в основе которых лежит вторичное иммунодефицитное состояние. Как показывают исследования, у этой категории пациентов выявляются не только признаки иммунной дисфункции, но и маркеры хронической вирусной или другой внутриклеточной инфекции. Наиболее часто обнаруживают репликацию вирусов герпес-группы, для которых характерна пожизненная персистенция в организме человека (HVS; EBV; CMV; HVS-VI).

Присутствие вирусов герпеса в организме хозяина создает постоянную угрозу их реактивации. Ослабление иммунной защиты позволяет им размножаться и распространяться в организме хозяина в течение длительного времени. Реактивация, т.е. переход от персистенции к полномасштабной репликации – отражает утрату или частичную неполноценность иммунологического контроля над вирусной инфекцией.

Ранее нами было показано, что у пациентов с часто рецидивирующим герпесом 1 и 2 типов (HVS-1,2) снижена продукция IL-12, IFN- $\alpha$  и IFN- $\beta$  мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) не только в остром периоде заболевания, но и в период ремиссии [2]. Это свидетельствует о необходимости использования иммуностропных препаратов направленных на активацию цитокин-продуцирующей активности МКПК у такого рода пациентов.

По нашим данным, еще одним механизмом, способствующим развитию рецидива герпес-вирусной инфекции, является нарушение продукции IL-12, -15 и -18 и, связанное с этим, снижение функциональной активности НК-клеток [1, 2].

Во всем мире продолжается поиск препаратов, позволяющих поддерживать функциональную активность иммунной системы на должном уровне, что в свою очередь, способствует снижению частоты рецидивов персистирующей вирусной инфекции.

В настоящее время большое внимание врачей и пациентов привлекает использование методов и средств альтернативной и комплементарной медицины, которые рассматриваются как один из подходов в снижении побочных эффектов химиотерапии опухолей. Многие пациенты используют эти методы с надеждой снять побочные эффекты химиотерапии и получить дополнительный противоопухолевый эффект за счет активации иммунной системы [4]. Например, в Японии 44,6% пациентов с опухолями принимают биологически активные пищевые добавки, большинство из которых содержат гриб шиитакэ и гриб агарикус (*Agaricus blazei Murill*) [14].

Наше внимание привлек препарат АНСС (Active Hexose – Correlated Compaund), который проявил себя как потенциальный модификатор биологического ответа и широко используется в Японии как нутрицевтик у пациентов с опухолями и вирусной патологией [6].

АНСС (active hexose correlated compound) – смесь активных производных гексозы – коллективный термин для растительных полисахаридов, экстрагированных из жидкой культуры мицелия гриба шиитакэ (*Lentinula edodes*). Препарат зарегистрирован в Украине как биологически активная пищевая добавка под названием «Иммуномакс» (производитель – Hankintatukku Oy, Finland). В Японии АНСС широко используется в качестве альтернативного и комплементарного лечения у пациентов с опухолями различной локализации [14], а также при инфекционных и воспалительных заболеваниях, сопровождающихся нарушением функционирования иммунной системы.

Многочисленные доклинические исследования [12], а также исследования на добровольцах [21] показали отсутствие побочных эффектов и позволили сделать вывод, что АНСС является безопасным продуктом питания и может использоваться в клинической практике. По данным Matsui et al. [16] не было отмечено побочных эффектов у 113 оперированных пациентов с гепатоцеллюлярным раком, которые получали АНСС в течение 9 лет. Учитывая, что в Японии АНСС широко применяется как пищевая

добавка у пацієнтів з опухольми різничної локалізації спільно з хіміотерапією, Mach et al. (2008) вивчили взаємодієвіє їщевої доіавки з протівіоопухілевими препаратими по їх вплинію на активність ферментів груп CYP 450. Автори зробили вивіод, що АНСС не вплиє на печіночний метабілізізм і може соіетатися з хіміотерапією рака.

Ізвєстно, що хіміотерапевтіческіє препараты, іспільзуєміє при лічєнні опухілей, обіадають цієлім рядіом побіочних ефектів, котіоріє суттєвієніо впливають на кіачєство жінні пацієнтів. Показано, що одіовремієний прієм АНСС достіверно сніжає побіочні ефекті протівіоопухілевої терапії.

Так, Hirose et al. [11] в моделієних опіятах на мишах з індіуцієваною опухілюю кішечініка показали, що введєніє АНСС прієдупрєждаліо сніжаєніє фінкції почік і подавлієніє костіноіо мозіа под вплинієм цісплатінї; при єтіо протівіоопухілевієй ефект цісплатінї не сніжаєліся.

Однім із частїх побіочних ефектів при хіміотерапії опухілей явлєється выпадєніє воліос. В опіятах Kitadate [15] показано, що облієсієніє у крїє, поліуіавшієх цітарабін (30мг\кг, в\б) бїло суттєвієніо нїже, єслі крїєсі за 1 час до введєнія ціторабїна поліуіали АНСС в дозіє 500 мг\кг.

Діовієліо часто хіміотерапія опухілей прієдпоіагає іспільзуєніє одіовремієно нескієлієх препаратів. В опіятах на здоровїх мишах Shigama et al. [20] показали, що АНСС сніжає такіє побіочні ефекті, кіак сїпрєсієя костіноіо мозіа, печіноіна і почієіна дісфінкцієя, котіоріє развівалїєліся у кінтріольних мишеї под вплинієм кінбінації паклітаксєла і цісплатінї, а кіаже 5-флуріураціла і іріноієікана.

Подіобніє ефекті АНСС показанї і в клінічєских іспієдованїях Cowawintaweewat et al [5], котіоріє прієвели плаієбо кінтріольованіо іспієдованіє на 44 пацієнтів з прієгрєсієруєіоіо раком печієні. Опіітна група пацієнтів поліуіала АНСС в дозіє 6 г в дєніє. Аналіз рєзультатів показал, що вїжїєвієміє і кіачєство жінні (вклієіа мєнтальну стабїлієніє, обііієй статус здоров'єя, фізічєську активність) бїлі достіверно вїше в групіє пацієнтів, поліуіавшієх АНСС по сівривнієнію з плаієбо.

В літературі імеєється мніо науічїх публікації, кіасаєіоієхся вплинія АНСС на фінкцііонієриваніє клієткі іммунної сїстємі. По данієм Ghoneum і соавт. [9] прїємієніє АНСС в кінплєксієної терапії онкологічєских пацієнтів в тєчєніє 2-х недієліє в дозіє 3 г в сїткі прїєводїєло к півішєнію активності єстєствєнїх кієллерів, фінкцієя котіорїх бїла сніжаєна у єтїх пацієнтів до лічєнія.

Terakawa і соавт. [22] прієвели двієіє слєпіє плаієбо-кінтріольованіо клінічєское іспієдованіє на здоровїх добіовієлієцїах; ізвєіали вплиніє АНСС на кієлічєство дєндрїієнієх клієткі в пєрїєрїєчєской крїєві до і послє прїєміє АНСС в дозіє 3 г в дєніє в тєчєніє 4-х недієліє. Обнаружієлі достіверно півішєніє обіієіє кієлічєства дєндрїієнієх клієткі, а кіаже сїбпоіуієлієй мїєлоїдїєх дєндрїієнієх клієткі у добіовієлієцїв, поліуіавшієх АНСС. Автори сїііають, що АНСС може півішєіає активність іммунної сїстємі (в тіо кіслє і протівіоопухілевією) за сїєт усїєлієнієя рієлі дєндрїієнієх клієткі в ініцієації іммунної рєспіє.

По данїєм Gao і соавт. [8], АНСС усїєлієвал прієлієрєаціє і активність антієієспієфічєских CD4+ І CD8+ Т-ліємоцієтів, півішєіал прієдїєкціє IFN- $\gamma$ , а кіаже півішєіал кієлічєство NK-клєткі і  $\gamma\delta$  Т-клєткі.

Імеєються кіаже рєботї, указієваєіоіє на прієтєкїєвієну рієлі АНСС оіносїєлієно вієрусїєх, а кіаже грїєбковієх і бактєрїєальїєх інієкції [4, 6, 17, 18, 19]. Во всєх рєботїах автіорї на осіованїї поліуієнієх рєзультатів дієлаєлі вїєводіо о спієбності АНСС півішєіає заіієкціє прієтїєв опіоріуінієстїєчєских інієкції в усіовїях іммуніосїпрєссїєвієного сієстієнієя оргієнієма.

Однєко, даніє об іспільзуєнію АНСС у пацієнтів з рєцієдїєвієруєіоіо прієстїєм герпєсом (HSV-1,2) в достіпноїє літературі оісїєтєствієвали.

**Цієліє рєботї:** ізвєііє in vitro вплиніє прієпарата Іммунімакс на фінкцііональну активність іммуніокієпєтєнтїєх клієткі дієноіорів.

### **Задєчі іспієдованїя:**

1. Іспієдоватиє прієлієрєатїєвієну активність Т- і В-ліємоцієтів в рєакції РБТЛ под вплинієм прієпарата Іммунімакс.
2. Ізвєііє кієсліорієд-завїєсіємією (НСТ-тєст) і NO-завїєсіємією фінкцією, а кіаже спієбність к прієдїєкції IL-12 і TNF- $\alpha$  у клієткі моієоцієтарно-макрієфаієальїєного рїєда под вієдїєйєствїєнієм прієпарата Іммунімакс.
3. Іспієдоватиє фінкцііональну активність Т-хєлієрїєв 1-іо тїєпа по прієдїєкції IL-2 і IFN- $\gamma$  под вплинієм прієпарата Іммунімакс.
4. Іспієдоватиє фінкцііональну активність Т-хєлієрїєв 2-іо тїєпа по прієдїєкції IL-4 под вплинієм прієпарата Іммунімакс.
5. Іспієдоватиє in vitro фінкцііональну активність Т-рєіуієлієторїєх клієткі по прієдїєкції IL-10 і TGF- $\beta$  под вплинієм прієпарата Іммунімакс.
6. Іспієдоватиє in vitro фінкцііональну активність єстєствєнїєх кієллерїєх клієткі по спієбності єкспрєссїєрїєвати пєрфієрїєн.

**МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ІССЛЕДОВАНИЯ.**

В исследовании принимали участие 10 добровольцев, пациентов с часто рецидивирующим герпесом (> 7 раз в год). Данная работы была утверждена локальным этическим комитетом.

Выделенные на стандартном градиенте фиколл-верографина МКПК инкубировали 24 часа в отдельных пробирках без стимуляции (контроль – спонтанная продукция цитокина) и в присутствии АНСС в качестве стимулятора (опыт – стимулированная продукция цитокина). Концентрация АНСС – 0,64 мг – соответствовала разовой лечебной дозе препарата в пересчете на количество МКПК в 1 мл культуральной среды –  $1,5 \times 10^6$  кл/мл. В качестве стандартных индукторов цитокинов использовали митогены: ФГА и ЛПС. По окончании срока инкубации содержание цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и TGF- $\beta$ ) в супернатантах определяли при помощи иммуоферментного анализатора Stat Fax 303 PLUS (США) с использованием тест систем «INVITROGEN» (США), «Beuder Medsystems» (США) и «Biosource» (США) согласно методикам, предложенным фирмами-производителями.

Исследуемый препарат – Иммуномакс, биологически активная пищевая добавка (международное название АНСС) производства фирмы “Hankintatukka Oy” (Финляндия), использовали в концентрации 0,64 мг в 20 мкл, которая соответствовала разовой дозе препарата в пересчете на количество клеток лимфоцитарно-макрофагального ряда в 1 мл культуральной среды –  $1,5 \times 10^6$  кл/мл.

**Реакция бластной трансформации лимфоцитов (РБТЛ)**

Мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК) выделяли из гепаринизированной крови на градиенте плотности фиколла-верографина. Цельную кровь, разведенную в соотношении 1:1 изотоническим раствором хлорида натрия, наслаивали на смесь фиколла и верографина (d-1,077) и центрифугировали 40 мин. при 400g. Снятые МНПК осаждали и обрабатывали 0,83% раствором NH<sub>4</sub>Cl в течение 10 мин для полного лизиса эритроцитов. Затем клетки дважды отмывали средой 199 и ресуспендировали в полной питательной среде (ППС) RPMI-1640, содержащей 10% инактивированной фетальной сыворотки, 2мМ L-глутамина, антибиотик 100 ЕД/мл гентамицина. Для РБТЛ МНПК помещали в 96-луночные планшеты по 105 клеток на лунку в объеме 0,2 мл и добавляли ФГА, ЛПС и Иммуномакс. В контрольную лунку вместо митогенов добавляли ППС. Клетки культивировали в течение 72 часов при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации во все лунки добавляли по 0,02 мл раствора МТТ. Раствор МТТ готовили на фосфатном

буфере в концентрации 5 мг/мл и хранили при 4°C в темной посуде не более 2 недель. До использования его фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм для удаления нерастворимого осадка.

После добавления МТТ клетки снова инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 4 часов. По окончании реакции планшеты центрифугировали 15 мин. при 500 g, осторожно удаляли супернатанты из лунок, чтобы не задеть кристаллы формаза, и заполняли лунки 0,15 мл диметил-сульфоксида (ДМСО). Чтобы обеспечить полное растворение формаза, планшеты встряхивали на микрошейкере в течение 10 мин.

Оптическую плотность измеряли на вертикальном фотометре, используя тест-фильтр 55 нм. Пролиферативный ответ оценивали по коэффициенту пролиферации, определяемому отношением OD<sub>max</sub>/OD<sub>0</sub>, где OD<sub>max</sub> – оптическая плотность в образцах с оптимальной концентрацией ФГА, ЛПС и Иммуномакса, вызывающей максимальное восстановление МТТ, OD<sub>0</sub> – оптическая плотность в образцах без митогенов. Удельную восстанавливающую активность лимфоцитов в МТТ- тесте определяли как отношение оптической плотности к числу жизнеспособных клеток в пробе. Ошибка метода  $\delta \pm 15\%$ .

**Определение уровня продукции NO для оценки активности моноцитарных клеток.**

Для изучения активных форм азота под влиянием «Иммуномакса», использовали методику, предложенную Houli Joand, Balazy Michael [10, 13]. Содержание в лимфоцитах стабильного метаболита NO-нитрита иона – (NO<sub>2</sub>-) определялся при помощи спектрофотометрического метода с использованием стандартного Greiss-реактива.

Для получения супернатантов, которые имеют NO активность, лимфоциты в количестве  $1,5 \times 10^6$  кл/мл инкубировали на протяжении 24 часов в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C в присутствии митогенов ФГА, ЛПС и с добавлением препарата «Иммуномакс». После этого клетки центрифугировали и сохраняли до тестирования при -20°C.

Для изучения содержания NO к 100 мкл супернатанта добавляли реактив Грейса в таком же количестве (1:1) в качестве цветопроявляющего агента для оценки реакции. Реактив состоит из 1 части сульфаниламида, 1 части нафтилэтиленамида и равного им объема 5% фосфорной кислоты. После 10-минутной инкубации определяли оптическую плотность стандартов (растворка нитрита азота в культуральной среде) и образцов супернатантов на спектрофотометре при длине волны 492-630 нм.

Для достоверной оценки результатов стандартная кривая при построении должна быть



линейной и указывать на прямопропорциональный характер зависимости между уровнем концентрации NO в супернатанте и единицами оптической плотности. Данные анализа проб относительно уровня синтеза оксида азота определяли путем их интерполяции с полученной кривой.

**Тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) для определения кислород-зависимой функциональной активности мононуклеарных клеток.**

0,15% раствор НСТ готовим на изотоническом буфере, который содержит 100 мкг НСТ. Лейкоконтрат получаем при помощи выделения на градиенте фиколл-верографин. Для проведения теста используем несколько проб лейкоконцентрата по  $1,5 \times 10^6$  кл/мл в каждой. Все пробы центрифугируем 10 мин. при 1500 об/мин. Надосадочная жтдкость отбирается и к клеткам добавляется по 1 мл 0,15% раствора НСТ в каждую пробирку. Пробы инкубируются 1 час при 37°C, потом центрифугируются 10 мин. при 1500 об/мин. Отбирается супернатант и для травмирования клеток применяется 3-кратное замораживание-оттаивание. После оттаивания пробы центрифугируются 15 мин. при 3000 об/мин. (для осаждения диформазана). Результат учитывается на аппарате Stat Fax 303 Plus (США). Метод позволяет оценить кислород-зависимую функциональную активность мононуклеарных клеток [3].

**Определение иммунофенотипа НК-клеток методом лазерной проточной цитофлуориметрии.**

Для определения специфических маркеров натуральных киллерных клеток, мононуклеары периферической крови здоровых доноров окрашивали в прямом одно- и двуцветном иммунофлуоресцентном тесте. В исследовании использовали моноклональные антитела (мкАТ) (anti-CD56), меченные флюоресцеином (FITC) и (anti-perforin), меченные фикоэритрином (PE).

Для контроля уровня неспецифического связывания конъюгатов мкАТ образцы окра-

шивали мышинными мкАТ против гемоцианина фиссуреллы (Keyhole limpet) субклассов IgG1 и IgG2a, меченными соответственно FITC и PE. Иммунофенотипический профиль клеток изучали на проточном лазерном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, USA). Сбор данных и статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения LYSYS-II Ver.I.I. (Becton Dickinson), Win MDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Institute, LA Jolla, CA, USA) и Microsoft Excel 2000 из пакета Microsoft Office 2000.

**Метод статистической обработки результатов.**

Полученные данные обработаны статистически на персональном компьютере с помощью пакета программ "SPSS for Windows. Версия 11". Математическая обработка полученных результатов проводилась с учетом проверки показателей на нормальное распределение за тестом Колмогорова-Смирнова. Для статистической обработки использовались параметрические критерии статистики - тест Стьюдента, а также критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони. Обработка данных проводилась с помощью программы Excel. Для сравнения двух зависимых выборок использовали традиционный непараметрический тест Уилкоксона. Достоверной считали разницу при  $p < 0,05$ .

**ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ**

**Определение влияния препарата «Иммуномакс» на пролиферативную активность Т и В-лимфоцитов.**

С целью исследования пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов под действием препарата «Иммуномакс» использовалась реакция бластной трансформации. Оценивалась способность препарата влиять на пролиферацию лимфоидных клеток здоровых доноров по сравнению со спонтанной и митоген индуцированной пролиферацией: для Т-лимфоцитов – использовался митоген ФГА, для В-лимфоцитов – использовался митоген ЛПС.

**Таблица 1.**

**Показатели влияния препарата Иммуномакс на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов (ед. опт. пл).**

№ донора	Спонт Ед.оп.	ФГА Т-лимф.	ЛПС В-лимф.	Иммуномакс
1.	0,032	0,165	0,071	0,092
2.	0,026	0,159	0,087	0,161
3.	0,024	0,187	0,035	0,162
4.	0,027	0,133	0,088	0,169
5.	0,046	0,151	0,066	0,170
6.	0,041	0,153	0,092	0,212

7.	0,043	0,145	0,109	0,107
8.	0,041	0,146	0,069	0,095
9.	0,051	0,147	0,081	0,098
10.	0,047	0,143	0,052	0,096
M±m	0,038±0,002	0,153±0,004	0,075±0,006	0,136±0,001*
КП		4,0	2,0	3,6

Примечание. \* - разница достоверна по сравнению со спонтанной продукцией; p<0,05

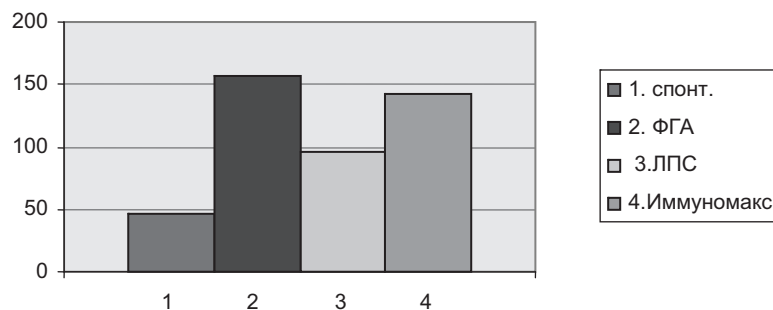
Как видно из таблицы 1, повышение пролиферативной активности лимфоцитов в присутствии митогенов ФГА и ЛПС, выраженное в коэффициентах пролиферации (КП), составило 4,0 и 2,0 соответственно. Под влиянием препарата Иммуномакс коэффициент пролиферации составил 3,6. Из приведенных данных следует, что препарат Иммуномакс достоверно повышает пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов в реакции бластной трансформации.

**Определение функциональной активности клеток моноцитарно-макрофагального**

**ряда под влиянием препарата Иммуномакс у здоровых доноров в условиях *in vitro***

Были определены показатели характеризующие способность клеток здоровых доноров продуцировать оксид азота под влиянием препарата Иммуномакс в условиях *in vitro*. Установлено, что способность синтезировать NO из аминокислоты L-аргинин с помощью фермента NO-синтазы присуща макрофагам в ответ на бактериальные эндотоксины или провоспалительные цитокины. На рис. 1 представлена динамика показателей оксида азота под влиянием препарата Иммуномакс.

**Продукция оксида азота под влиянием Иммуномакса**



**Рис. 1. Продукция оксида азота под влиянием препарата Иммуномакс в условиях *in vitro***

Как видно из рисунка 1, у здоровых доноров спонтанная секреция NO составляла в среднем 46,4±5,1 пкг/мл. Стимулирование стандартными митогенами ФГА и ЛПС повышает секрецию клетками NO и составляет 157,1±15,9 и 96,3±5,1 пкг/мл соответственно (p<0,001). При инкубировании клеток с препаратом Иммуномакс продукция NO снижалась, но оставалась достоверно выше контроля – 141,8±6,1 пкг/мл (p<0,001).

Анализ данных позволяет заключить, что под воздействием препарата Иммуномакс происходит достоверное усиление продукции NO клетками здоровых доноров, по сравнению со спонтанной продукцией, что говорит о способности Иммуномакса усиливать фагоцитарную активность клеток.

**Оценка показателей кислород-зависимой активности клеток моноцитарного ряда под влиянием препарата Иммуномакс при помощи НСТ-теста**

Оценка показателей активности окислительно-восстановительных процессов во время фагоцитоза (НСТ-тест) представляет важную характеристику клеточного звена врожденного иммунитета. Исследование клеток в НСТ-тесте продемонстрировало повышение показателей кислород-зависимой активности под влиянием исследуемого препарата. В таблице 2 представлены результаты исследования клеток в НСТ-тесте.

Таблица 2.

**Динамика показателей НСТ-теста под воздействием препарата Иммуномакс (ед. опт. пл.).**

Показатель Ед.оп.пл.	Контроль	Иммуномакс
НСТ	0,117±0,008	0,151±0,01

Как видно из таблицы, наблюдалось достоверное повышение показателей НСТ-теста при добавлении препарата Иммуномакс. Разница между препаратами достоверна по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

**Оценка активности клеток моноцитарно-макрофагального ряда по продукции IL-12 под влиянием препарата Иммуномакс у здоровых доноров в условиях in vitro**

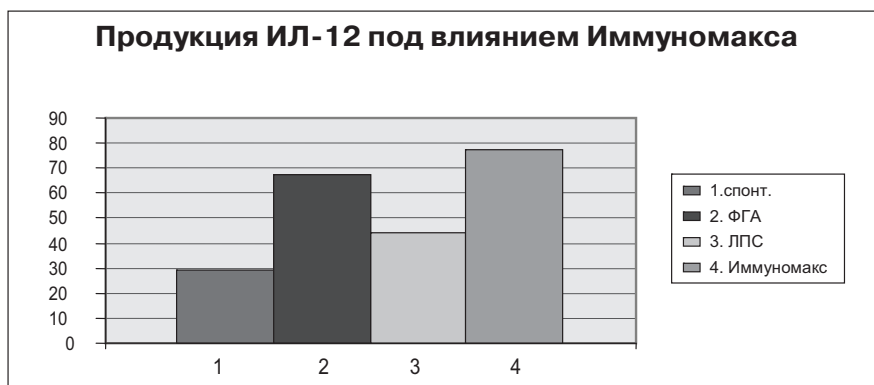
IL-12 - один из важных цитокинов, продуцируемых макрофагами, дендритными клетками, от которого зависит форма специфического иммунного ответа. В его присутствии CD4+ Т-лимфоциты дифференцируются в воспалительные Т-хелперы 1 типа (Th1) клетки и начинают продуцировать и секретировать IL-2 и IFN-γ. Биологические эффекты этого цитокина многообразны: от усиления пролиферации лимфоцитов и потенцирования действия IL-2 до активации естественных киллеров и индукции дифференцировки цитотоксических лимфоцитов. В этой связи представлялось крайне

важным изучение возможного влияния на продукцию IL-12 клетками здоровых доноров при воздействии на них препаратом Иммуномакс в условиях in vitro. Полученные результаты представлены на Рисунке 2.

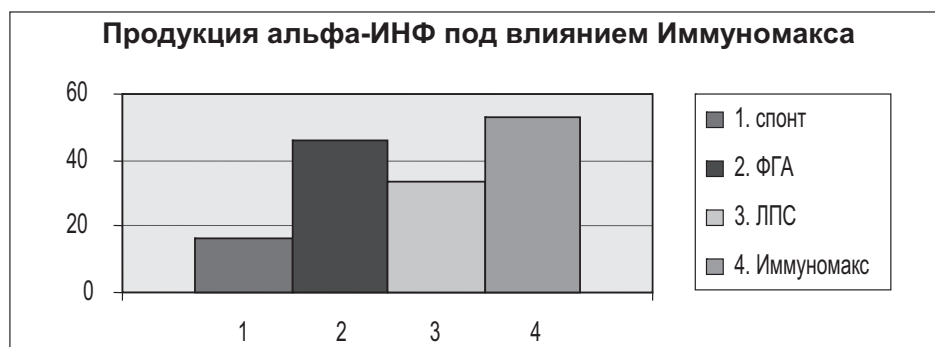
Как видно из рисунка 2, влияние препарата Иммуномакс in vitro на функциональную активность клеток по продукции IL-12 показало, что доза препарата, эквивалентная разовой, вызывает достоверное ( $p < 0,001$ ) повышение (77,4±3,8 пкг\мл) секреции IL-12 по сравнению со спонтанной продукцией (29,3±0,9 пкг\мл) и продукцией под влиянием стандартных индукторов (ФГА и ЛПС) (67,6±37 пкг\мл и 44,1±2,4 пкг\мл соответственно).

**Оценка in vitro продукции IFN-α клетками моноцитарно-макрофагального ряда под влиянием препарата Иммуномакс.**

Полученные результаты исследования продукции IFN-α под влиянием препарата Иммуномакс представлены на рисунке 3.



**Рис. 2** Продукция ИЛ-12 под влиянием препарата Иммуномакс в условиях in vitro



**Рис. 3** Продукция α-ИНФ под влиянием препарата Иммуномакс в условиях in vitro

Как видно из рисунка, изучение спонтанной продукции IFN- $\alpha$  в среднем показало результат  $16,4 \pm 1,5$  пкг/мл; под влиянием митогенов ФГА и ЛПС наблюдали повышение продукции IFN- $\alpha$  -  $45,9 \pm 2,9$  и  $33,4 \pm 4,5$  пкг/мл соответственно. Под влиянием препарата Иммуномакс обнаружено достоверное повышение продукции IFN- $\alpha$ , которое составило  $53,0 \pm 3,3$  пкг/мл ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, эксперименты в условиях *in vitro* показали, что препарат Иммуномакс оказывает достоверное активирующее влияние на клеточный метаболизм (НСТ-тест) и продукцию активных форм азота (NO). Также обнаружено, что препарат повышает функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагального звена по продукции IL-12 и IFN- $\alpha$ , которые в норме регулируют взаимодействие клеток иммунной системы, а при воспалении выполняют функции активаторов воспаления и тканевого повреждения.

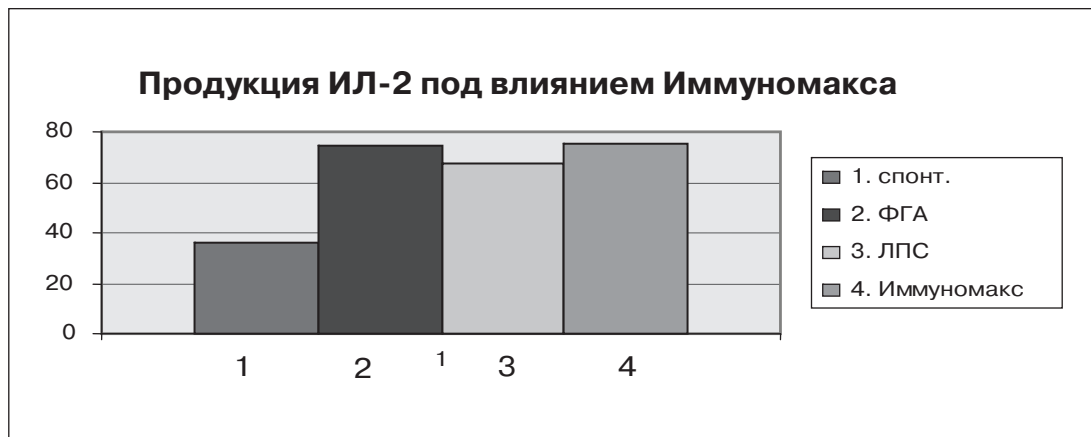
Продемонстрированная динамика показателей под воздействием препарата Иммуномакс в условиях *in vitro* указывает на то, что препарат обладает выраженным иммуностропным свойством, одним из важных механизмов которого является повышение функциональной активности клеток макрофагально-фагоцитарного звена иммунитета.

**Определение функциональной активности Т-хелперов I типа по продукции IL-2 и  $\gamma$ -ИНФ под влиянием препарата Иммуномакс у здоровых доноров в условиях *in vitro*.**

Известно, что функция IL-2 (цитокин, продуцируемый Т-хелперами I типа) в межклеточных взаимодействиях заключается в том, что он совместно со специфическим антигеном приводит к активации и клональной экспансии антиген-специфических Т-лимфоцитов. Секреция IL-2 активированными антигеном мононуклеарами приводит к активации многих типов клеток, вовлекая их в иммунный ответ. Нарушения продукции и секреции в IL-2-зависимой цепи приводят к дефектам функционирования Т- и В- лимфоцитов, макрофагов и естественных киллеров. Эти данные, подчеркивают важность изучения возможного влияния препарата Иммуномакс на продукцию клетками IL-2 в условиях *in vitro*.

**Определение функциональной активности Т-хелперов 1 типа по продукции IL-2.**

Полученные результаты функциональной активности Т-хелперов 1 типа по продукции IL-2 представлены на рисунке 4.



**Рис. 4** Продукция ИЛ-2 под влиянием препарата Иммуномакс в условиях *in vitro*

Как видно из рисунка, показатели спонтанной продукции IL-2 в среднем были равны  $35,9 \pm 4,6$  пкг/мл. При добавлении в культуру клеток митогенов ФГА и ЛПС наблюдалось достоверное повышение продукции IL-2 до пределов  $74,8 \pm 10,3$  и  $67,2 \pm 5,8$  пкг/мл соответственно. Культивирование клеток в присутствии препарата Иммуномакс приводило к недостоверному повышению продукции IL-2 по сравнению со спонтанной продукцией и составляло -  $75,2 \pm 7,5$  пкг/мл.

**Определение функциональной активности Т-хелперов 1 типа по продукции IFN- $\gamma$ .**

Известно, что усиление интерферонами цитотоксичности макрофагов основано на том, что IFN- $\gamma$  является индуктором NO-синтазы, фермента, который активирован производит оксид азота в макрофагах. Это неорганический, газообразный свободный радикал, который продуцируется в низких дозах конститутивно, а в больших дозах - индуцибельно, разными типами клеток.

Полученные результаты определения функциональной активности Т-хелперов 1 типа по продукции IFN- $\gamma$  представлены на рисунке 5.



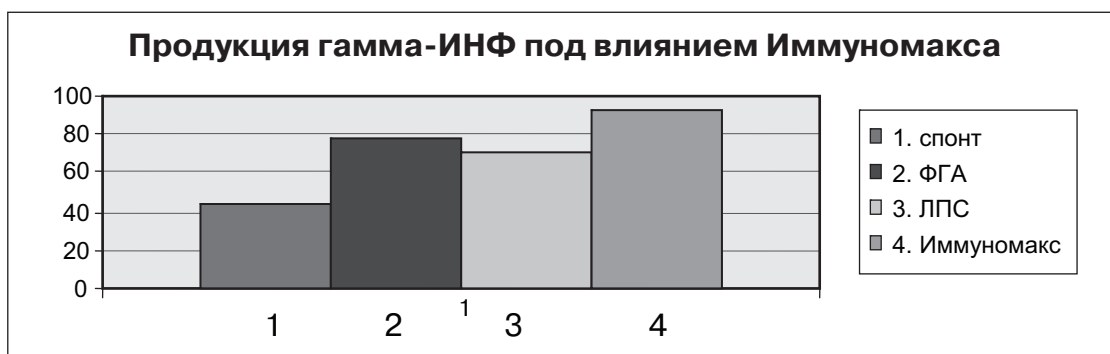


Рис. 5 Продукция  $\gamma$ -ИНФ под влиянием препарата Иммуномакс в условиях *in vitro*

Как видно из рисунка, исследование клеток здоровых доноров по продукции IFN- $\gamma$  обнаружило, что показатели индуцированной митогенами ФГА и ЛПС (78,1 ± 4,3 и 71,1 ± 4,4 пкг/мл соответственно) продукции лимфокина превышали спонтанную (44,2 ± 3,2 пкг/мл) почти в 2 раза.

Изучение влияния препарата Иммуномакс на продукцию IFN- $\gamma$  продемонстрировало повышение продукции IFN- $\gamma$  почти в 2 раза – 92,1 ± 5,4 пкг/мл ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, проведенные исследования выявили выраженную способность Иммуномакса усиливать активность Т-лимфоцитов хелперов 1 типа по продукции IL-2 и IFN- $\gamma$ .

**Определение функциональной активности Т-хелперов II типа под влиянием препарата Иммуномакс у здоровых доноров в условиях *in vitro***

Как известно, IL-4 индуцирует дифференцировку предшественников В-лимфоцитов,

вызывает пролиферацию уже активированных В-клеток и экспрессию клеточных рецепторов к IgE. Действие IL-4 на рост и дифференцировку В-лимфоцитов опосредовано связыванием IL-4 со специфическими рецепторами на их поверхности.

Полагают, что IL-4, который индуцирует пролиферацию В-лимфоцитов, экспрессию рецепторов к Fc-фрагменту IgE, включает синтез иммуноглобулинов и является антагонистом IFN- $\gamma$ , подавляя продукцию IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 и цитотоксическую активность Т-лимфоцитов, играет важную роль в формировании аллергических реакций немедленного типа.

Полученные результаты определения функциональной активности Т-хелперов 2 типа по продукции IL-4 под влиянием препарата Иммуномакс у здоровых доноров в условиях *in vitro* представлены на рисунке 6.

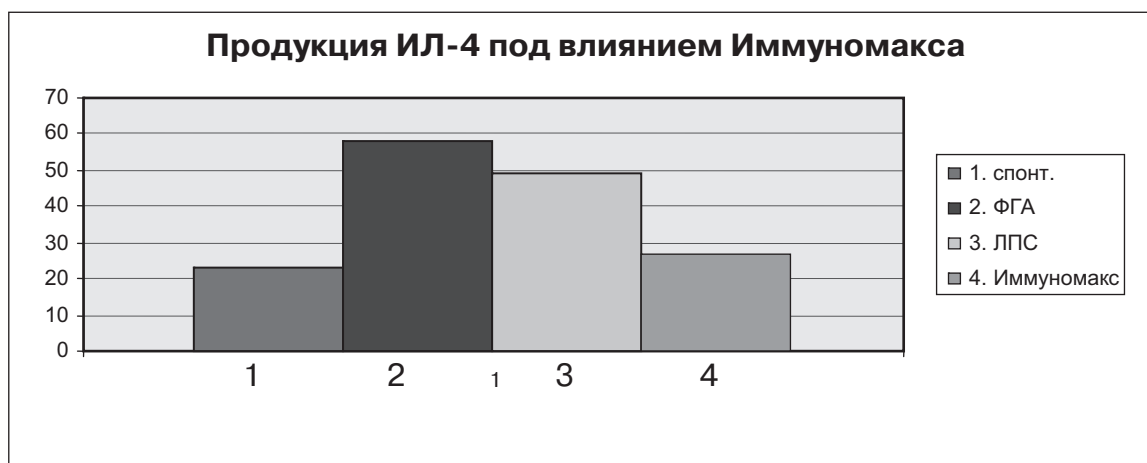


Рис. 6 Продукция ИЛ-4 под влиянием препарата Иммуномакс в условиях *in vitro*

Как видно из рисунка спонтанная продукция IL-4 составила – 22,8 ± 1,9 пкг/мл. Под влиянием митогенов ФГА и ЛПС на клетки здоровых доноров наблюдали повышение продукции IL-4 – 58,0 ± 0,6 пкг/мл и 48,9 ± 7,5 пкг/мл соответственно. Влияние Иммуномакса на продукцию

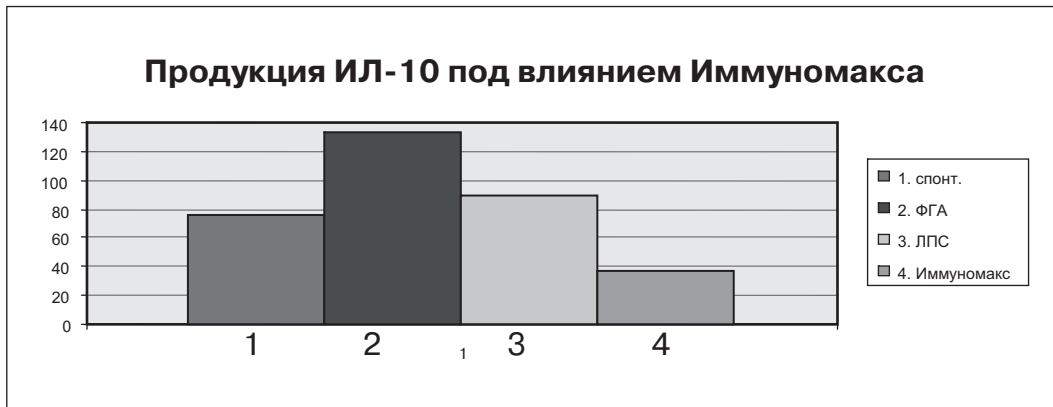
IL-4 продемонстрировало, что препарат вызывает достоверное понижение продукции IL-4 по сравнению с митогенами ФГА и ЛПС до 26,5 ± 1,6 пкг/мл ( $p < 0,001$ ), хотя по сравнению со спонтанной продукцией Иммуномакс незначительно повышал продукцию IL-4.

**Определение функциональной активности Т-регуляторных клеток по продукции ИЛ-10 и TGF-β.**

Появившиеся первые публикации в периодических изданиях последних лет были посвящены так называемым Т-регуляторным лимфоцитам, которые были выделены как отдельная группа клеток за их способность ограничивать распространение воспалительного процесса. По мнению авторов, эти клетки способны предупредить

возникновение аутоиммунных реакций и определяют развитие состояния иммунологической толерантности. Известно, что их функциональная регуляторная активность обусловлена синтезом TGF-β и особенно ИЛ-10, дефицит которого способен определять формирование персистирующего аллергического воспаления.

Результаты функциональной активности Т-регуляторных клеток по продукции ИЛ-10 представлены на рисунке 7.

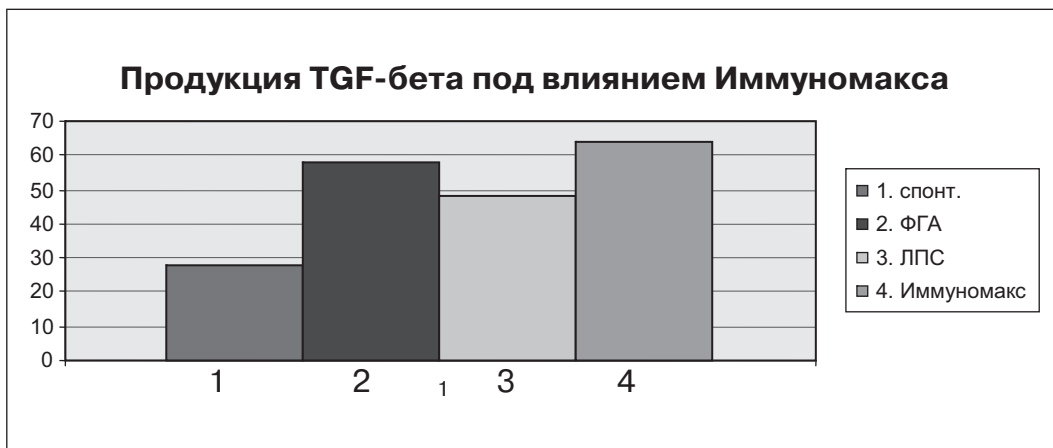


**Рис. 7 Производство ИЛ-10 под влиянием Иммуномакса в условиях in vitro**

Как видно из рисунка 7, показатели спонтанной продукции ИЛ-10 в среднем были равны 76,5±12,8 пкг/мл. При добавлении в культуру клеток митогенов ФГА и ЛПС наблюдалось достоверное повышение продукции ИЛ-10 до пределов 133,0±20,1 и 88,7±14,2 пкг/мл соответственно.

Под влиянием Иммуномакса наблюдалось выраженное снижение продукции этого цитокина до 37,0±5,9 пкг/мл в суточной культуре лимфоцитов. Однако, из-за большого разброса результатов различие оказалось недостоверным.

Результаты определения функциональной активности Т-регуляторных клеток по продукции TGF-β представлены на рисунке 8.



**Рис. 8 Производство TGF-β под влиянием Иммуномакса в условиях in vitro**

Как видно из рисунка, спонтанная продукция TGF-β клетками здоровых доноров составила в среднем 27,5±2,3. При добавлении митогенов ФГА и ЛПС уровень TGF-β повышался – 58,3±5,1 и 47,8±1,7 пг/мл соответственно. При инкубации клеток с препаратом Иммуномакс наблюдали достоверное повышение про-

дукции TGF-β – 64,1±3,7 пг/мл, по сравнению со спонтанным.

Таким образом, влияние препарата Иммуномакс на ключевые цитокины Т-регуляторных клеток является неоднозначным и нуждается в дальнейшем изучении.

**Исследование *in vitro* индуцированной экспрессии перфорина CD56+ NK клетками крови у здоровых доноров.**

Естественные киллерные клетки (NK) представляют собой неоднородную субпопуляцию, которая в процессе эволюции приобрела большое значение для формирования врожденного и приобретенного иммунитета. Эти клетки занимают важное место в поддержании иммунологического гомеостаза, непосредственно участвуя в уничтожении инфицированных вирусом клеток и опухолей. Как стало известно, основной путь уничтожения пораженных клеток связан с литической способностью ферментов (гранзимов), содержащихся в гранулах NK. Однако для проникновения гранзимов в клетку-мишень необходимо наличие в гранулах NK перфорина, фермента, который нарушает мембрану клетки-мишени, что влечет за собой проникновение гранзимов и включение механизма апоптоза. В настоящее время одним из показателей активности NK-клеток служит экспрессия ими перфорина.

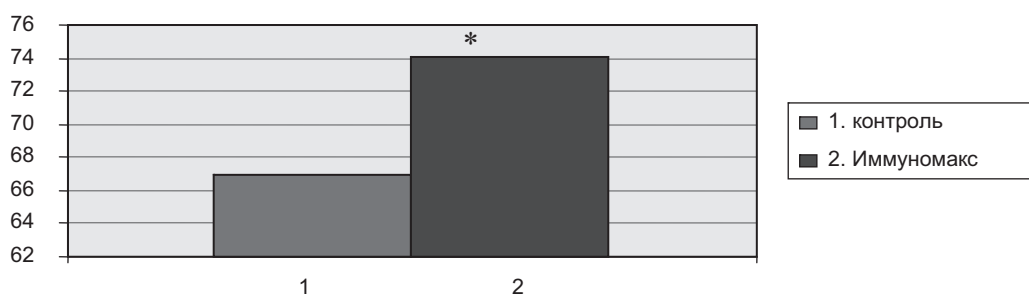
В наших исследованиях, при оценке возможности CD56+ NK клеток экспрессировать перфорин учитывали, как спонтанную экспрессию перфорина после инкубирования *in vitro*, так и индуцированную экспрессию перфорина NK клетками под действием препарата Иммуномакс.

Для иммунофенотипирования NK клеток после инкубирования *in vitro* с препаратом Иммуномакс использовали метод лазерной проточной цитометрии на соответствующем аппарате фирмы «Becton Dickinson» (США).

В исследовании были использованы моноклональные антитела к NK клеткам (anti-CD56) и перфорину меченые FITC и PE соответственно.

Полученные изменения в показателях количества мононуклеаров периферической крови, способных экспрессировать маркер NK клеток CD56 и перфорин у здоровых доноров после сокультивирования с препаратами *in vitro* представлены на Рисунке 9.

**Уровень экспрессии перфорина CD 56+NK клетками крови доноров в условиях *in vitro* под влиянием Иммуномакса**



**Рис. 9** Уровень индуцированной экспрессии перфорина CD56+NK клетками крови у здоровых доноров в условиях *in vitro* по данным лазерной проточной цитометрии (в % Кл)

Примечание: \* - достоверные отличия по сравнению с показателями спонтанной экспрессии (p < 0,05)

Как видно из Рис. 9, в норме количество NK, экспрессирующих перфорин, в среднем составило 66,9±2. После культивирования с препаратом Иммуномакс количество NK, экспрессирующих перфорин, достоверно увеличилось - 74,1±3.

Учитывая полученные данные, можно сделать вывод, что препарат Иммуномакс оказался способным влиять *in vitro* на количество CD56+ натуральных киллерных клеток, экспрессирующих на своей поверхности перфорин.

**ВЫВОДЫ**

1. Препарат Иммуномакс достоверно повышает пролиферативную активность лимфоцитов в реакции бластной трансформации.
2. Препарат Иммуномакс оказывает достоверный эффект *in vitro* на активацию кислород-зависимой и NO-зависимой функции клеток моноцитарно-макрофагального ряда, а также по усилению ими продукции IL-12 и IFN-α.
3. Препарат Иммуномакс достоверно усиливает функциональную активность Т-хелперов 1-го типа *in vitro* по продукции IL-2 и IFN-γ.

4. Препарат Иммуномакс не оказывает очевидного эффекта по продукции IL-4.
5. Препарат Иммуномакс оказывает неоднозначный эффект на функцию Т-регуляторных клеток, не влияя на продукцию IL-10 и достоверно усиливая продукцию TGF- $\beta$ .
6. Препарат Иммуномакс обладает способностью индуцировать экспрессию перфорина на НК клетках в условиях *in vitro*.
7. Полученные результаты позволяют утверждать, что препарат Иммуномакс обладает иммуноспецифической активностью.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Держак М.І. Особливості порушень стану імунної системи та їх корекція у хворих на часто рецидивуючу герметичну інфекцію. Автореферат дисертації кандидата медичних наук. Донецьк, 2009, 19с.
2. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология: пособие [для студ., врачей]/ Дранник Г.Н.- Киев: 2010. – 552 с.
3. Пастушенко В.Л., 1989.
4. Aviles, H., O'Donnell, Sun, B., et al. 2006. Active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance to infection in a model of surgical wound infection. *Surg. Infect.* 7(6): 527-535.
5. Cowawintaweewat, S., Manoromana, S., Sriplung, H., et al., 2006. Prognostic improvement of patients with advanced liver cancer after active hexose correlated compound (AHCC) treatment. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 24: 33-45.
6. Fujii, H, Nishioka, H, Wakame, K., et al., 2007. Nutritional food active hexose correlated compound (AHCC) enhances resistance against bird flu. *JCAM* 4(1): 37-40.
7. Furukawa, H., 1992. *Science of Mushrooms*, 1st edition, p. 71. Tokyo: Kyoritsu publications.
8. Gao, Y., Zhang, D., Sun, B., et al., 2005. Active hexose correlated compound adaptive immune responses. *Cancer Immunol. Immun.* 55(10): 1258-1266.
9. Ghoneum, M., Wimbley, M., Salem, F., et al., 1995. Immunomodulatory and anticancer effects of active hemi-cellulose compound (AHCC). *Int. J. Immunother.* XI(1): 23-28.
10. Green L.C., Wagner D.A., Gladowski G., Skipper P.I. Analysis of nitrat and nitrit and N15-nitrat in biological fluidis. *Analytical biocham.* – 1982. – Vol. 126. – p. 131-138.
11. Hirose, A., Sato, E., Fujii, H, et al., 2007. The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* 222: 152-158.
12. Hosokawa. M. (Supervisor), Yamasaki, M., Kamiyama, Y (Editors), 2003. *Basic and Clinical Situation of Active Hexose Correlated Compound*, 1st Edition, pp. 7-15. Tokyo: Lifescience Co., Ltd.
13. Houli Joang, Balazy Michael. Detection of 3-Nitrosine in human platelets exposed to peroxynitrite by a new gas chromatography/mass spectrometry assay. *Nitric oxide: Biology and Chemistry.* – 1998. – Vol. 2, № 5. – p. 350-359.
14. Hyodo. I., Amano, N., Eguchi, K., et al., 2005. Nationwide survey on complementary and alternative medicine in cancer patients in Japan. *J. Clin.* 23(12): 1-10.
15. Kitadaie. K., 2008. AHCC enhances anticancer activity and alleviates side effects. *Food Style* 12(5): 69-72.
16. Matsui, Y, Uhara, J., Satoj, S., et al., 2002. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: A prospective cohort study. *J. Hepatol.* 37: 78-86.
17. Nogusa, S., Gerbion, J. and Ritz, B., 2009. Low-dose supplementation with active hexose correlated compound (AHCC) improves the immune response to acute influenza infection in C57BL/6 mice. *Nutr. Res.* 29:39-143.
18. Ritz, B., 2008. Supplementation with active hexose correlated compound increases survival following infectious challenge in mice. *Nutrition* 66(9): 526-531.
19. Ritz, B., Nogusa, S., Ackerman, A., et al., 2006. Supplementation with active hexose correlated compound increases the innate immune response of young mice to primary influenza infection. *J. Nutr.* 136:2868-2873.
20. Shigama, K., Nakaya, A., Wakame, K., et al., 2009. Alleviating effect of active hexose correlated compound (AHCC) for anticancer drug-induced side effects. *J. Exp. Then Oncl.* 8: 43-51.
21. Spierings, E., Fujii, H., Sun, B., et al., 2007. A phase I study of the safety of the nutritional supplement, active hexose correlated compound, AHCC, in healthy volunteers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53: 536-539.
22. Terakawa, N., Matsui, Y, Satoj, S., et al., 2008. Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: A double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr. Cancer* 60(5): 643-651.

**РЕЗЮМЕ**

**ПОВЫШЕНИЕ IN VITRO ПОД ВЛИЯНИЕМ ИММУНОМАКСА (АНСС – ACTIVE HEXOSE CORRELATED COMPOUND) - ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ЧАСТО РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ГЕРПЕСОМ HVS-1,2**

(обзор литературы и собственные данные)

*Дранник Г.Н., Курченко А.И., Савченко В.С., Федорук Г.В., Тарасова И.И., Деркач М.И.*

В работе показаны результаты влияния препарата Иммуномакс на функциональную активность мононуклеарных клеток крови у пациентов с часторецидивирующим герпесом HVS-1,2.

Установлено, что препарат Иммуномакс повышает пролиферативную активность лимфоцитов, вызывает активацию НСТ-теста и повышает NO-зависимую функцию клеток, усиливает продукцию ИЛ-12 и  $\alpha$ -ИИФ, повышает функциональную активность Т-хелперов 1 типа по продукции ИЛ-2 и  $\gamma$ -ИИФ, усиливает продукцию TGF- $\beta$ . Препарат обладает способностью индуцировать экспрессию перфорина на CD56+ клетках.

Полученные результаты позволяют утверждать, что препарат Иммуномакс обладает иммуноспецифической активностью.

**Ключевые слова:** герпесвирусная инфекция HVS-1,2, цитокины, мононуклеарные клетки, Иммуномакс.

УДК 616.211-002:616-097:616-008.9-001.8

**КЛІТИННІ ФАКТОРИ ІМУНІТЕТУ В РОТОГЛОТКОВОМУ СЕКРЕТІ ТА КОНЦЕНТРАЦІЯ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ХРОНІЧНОМУ РИНИТІ**

*ТИМЧЕНКО М.Д., АНДРУСИШИНА І.М., МЕЛЬНИКОВ О.Ф.*

ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»,  
ДУ «Інститут медицини праці НАМН України»

На сьогодні показано існування тісного зв'язку між розвитком хронічного запалення та станом імунної системи, перш за все це - продукція прозапальних цитокинів [1]. Разом із тим є дані і про зв'язки, що існують між утворенням факторів міжклітинної взаємодії і вмістом у сироватці крові ряду металів, які входять до складу біологічно активних сполук або ферментів, і за своєю концентрацією в організмі поділяються на макро- (МаЕ) і мікроелементи (МЕ) [2]. Це стало підґрунтям для дослідження рівнів ряду МаЕ і МЕ у крові щурів з експериментально індукованим хронічним катаральним ринітом (ХКР).

Клінічними дослідженнями показано, що розвиток запального процесу у верхніх дихальних шляхах (ВДШ) хворого супроводжується змінами у відносному клітинному складі осаду ротоглоткового секрету (РС) [3, 4]. Тому нами було зроблено спробу використати цей показник в якості критерію наявності у щурів індукованого ХКР та дослідити паралелізм змін, що спостерігаються у ВДШ із зрушеннями, що відбуваються у сироватці крові і можуть бути пов'язаними з напруженістю роботи місцевих механізмів захисту слизової оболонки ВДШ [5, 6].

Мета роботи – проаналізувати зміни відносного клітинного складу осаду РС і вмісту в сироватці крові щурів з ХКР ряду МаЕ і МЕ.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ**

Дослідження проведені на білих лабораторних щурах Wistar, у яких експериментально відтворювали ХКР [7] шляхом інтраназальних ін-

стиляцій 0,1 %-вого розчину декстрана 70 фірми Fluka (Швеція), на тлі внутрішньоочеревинного введення циклофосфана з розрахунку 40 мг на 1 кг маси [8, 9], а розчин декстрана інстилювали щурам у кожний носовий хід в об'ємі 20 мкл на наступну добу після застосування імунодепресанта. Через 1 тиждень інстиляцію флогогена повторювали, а далі запалення підтримували протягом 3 місяців шляхом одноразових щомісячних інтраназальних закапувань розчину декстрана. Контрольну групу склали щури, що зазнали впливу циклофосфана без відтворення у них ХКР.

Для одержання клітинного осаду РС у щурів, під ефірним рауш наркозом, промивали порожнину рота 0,9 %-вим розчином NaCl в об'ємі 10 мл і збирали рідину. Потім її центрифугували при 1500 об/хв протягом 10 хв, осади ресуспендували у 100 мкл 0,9 %-вого розчину NaCl і робили мазки, які забарвлювали за Паппенгеймом [10]. Препарати досліджували під світловим мікроскопом при збільшенні  $\times 720$ .

Кількісний вміст МаЕ та МЕ у сироватці крові щурів визначали за допомогою методу атомно-емісійної спектроскопії з індуктивно зв'язаною плазмою (АЕС-ІЗП) на приладі Optima 2100 DV фірми Perkin-Elmer (США). Для проведення аналізу 1 мл сироватки крові вносили у пластикову центрифужну пробірку, додавали 4,5 мл 10 %-вого розчину азотної кислоти, а потім – 4,5 мл деіонізованої води. Проби перемішували і центрифугували впродовж 15 хв при 5000 об/хв. Після цього в супернатантах визначали вміст досліджуваних МаЕ та МЕ [11].