

СТАН КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНОК ІМУНІТЕТУ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РИНИТУ ТА ЙОГО ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ

¹Харківська академія післядипломної освіти (м. Харків)

²Харківський національний фармацевтичний університет (м. Харків)

kryghna@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана у відповідності із планом науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету («Технологія одержання оригінальних та комбінованих фармацевтичних засобів у різних формах», НДР № 0108U009174.; «Розробка складу, технології та біофармацевтичні дослідження лікарських засобів на основі природної та синтетичної сировини», НДР № 0114U000945, 2014-2019 рр.).

Вступ. Більшість антигенів надходять в організм через поверхню слизових оболонок, покритих слизом та антимікробними продуктами, і збагаченими як вродженими, так і адаптивними компонентами захисту організму. Слизова оболонка респіраторного тракту представлена місцевим імунітетом – MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissues) [1,2]. Імунна система слизових оболонок ділиться на неспецифічний імунітет і набутий (специфічний або адаптивний) імунітет, які формуються в процесі життя чи є вродженими. До клітинних імунних неспецифічних захисних чинників належить функція макро- і мікрофагоцитів, натуральних кілерних (NK) клітин, антигенпрезентуючих клітин (дендритні клітини та макрофаги), а до гуморальних – антибактеріальні та антивірусні речовини зовнішніх секретів: лактоферрин, лізоцим, інтерферони, дефензини, кателіцидини, лектини, цитокіни тощо [3,4]. Популяція NK-клітин представлена зернистими лімфоцитами, які забезпечують елімінацію клітин, інфікованих вірусами, деякими бактеріями і найпростішими. Після захоплення антигену антигенпрезентуючі клітини, що перебувають у епітелії, мігрують у MALT та ініціюють адаптивні імунні реакції шляхом індукції і проліферації та диференціювання Т-клітин [5,6]. Дослідження показали, що епітеліальні клітини є як джерелом, так і мішенню для численних цитокінів, і що така сигналізація та кооперація може суттєво вплинути на результат захворювання слизової оболонки. Важливими цитокінами є інтерферони (IFN) типів α , β , γ , ω . З них IFN- γ (виділяють NK-клітинами) є найбільш сильним активатором макрофагів [7]. Таким чином, в рамках MALT слизових бронхіального і назо-фарингеального трактів, імунну відповідь реалізують Т- і В-клітини, їх популяції і субпопуляції.

Основна увага в публікаціях, присвячених з'ясуванню ролі місцевої несприйнятливості, приділена факторам специфічного імунітету, а саме вмісту різних класів імуноглобулінів в секретах MALT [8]. Що стосується дослідження стану імунітету резистентності в секретах MALT у відповідь на хімічні чи біологічні чинники та за умов застосування лікарських препаратів місцевої дії, таких досліджень в літературі вкрай мало. Тому вивчення механізмів місцевого імунітету слизової носу, які в першу чергу

включаються в захист організму від різних назальних антигенних впливів, дозволить не тільки більш повно представити патогенез захворювань, але і розробити раціональні методи терапії і профілактики на прикладі комплексного гелю місцевої дії «Імбирол», що містить комплекс ефірних олій (імбиру, шавлії мускатної, майорану та чайного дерева).

Метою роботи стало дослідження імунітету резистентності в умовах експериментального риніту та його фармакологічної корекції на базі Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ. Наукова новизна полягає у фармакологічному дослідженні вперше створеному гелю «Імбирол» та його впливу на перебіг імунітету процесів слизової оболонки носа. Практична значущість проведення низки імунітету досліджень нового гелю для медичної практики полягає у впровадженні першого доклінічного етапу досліджень гелю «Імбирол».

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводились на моделі гострого запалення носової порожнини, викликаного їдким натрієм (тампон щуром вводили у кожную ніздрю одноразово, час експозиції становив 3 сек.) та інфікованих *S. aureus*. Експериментальні групи протягом 14-ти днів поспіль лікували досліджуваним гелем «Імбирол» та препаратом порівняння «Піносол» [9]. В експерименті використовували 18 щурів, яких після розвитку патології (3-я доба експерименту) розподіляли на групи. Перша група – позитивний контроль (тварини, яких не лікували після розвитку патології), в другу та третю групи були відібрані тварини, яким інтраназально вводили досліджуваний гель та референтний препарат відповідно. Із імунітету показників визначали в крові: активність натуральних кілерних клітин (НКК), титр гетерофільних аглютининів та гемолізінів. Активність NK клітин оцінювали в цитотоксичному тесті, заснованому на оцінці їх здатності лізувати трансформовані клітини. NK клітини виділяли на градієнті з густиною 1,062–1,064. Концентрацію клітин брали в дослід 5 \times 10⁶ кл/мл. В якості клітин-мішеней були клітини лінії Нер-2, які брали в концентрації 5 \times 10⁴ кл/мл. Оптичну густину супернатанту визначали на імуноферментному аналізаторі при довжині хвилі 540 нм. Індекс NK клітин визначали по формулі:

$$[(T_d - T_k) / T_d] \times 100 \%, \text{ де}$$

T_d – оптична густина в досліді, T_k – оптична густина в контролі.

Вивчення стану гуморальної ланки імунітету проводили шляхом дослідження рівня природних антитіл гемолізінів та гетерофільних аглютининів в сироватці крові. Рівень природних антитіл гемолізінів оцінювали за ступенем гемолізу еритроцитів барана під дією гемолізінів сироватки крові в присутності комплементу. Рівень природних гетерофільних анти-

тіл визначали в реакції аглютинації з еритроцитами барана (реакція Пауля-Буннелля) [10].

Експериментальні дослідження було проведено з дотримання вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Статистичний аналіз даних проводили із визначенням середнього арифметичного значення (\bar{X}) та його статистичної похибки (S_x) для груп із нормальним розподілом ознак, та медіани (Me) і мінімальних та максимальних дат для груп із ненормальним розподілом ознак. Для аналізу відмінностей використовували критерій Ньюмена-Кейсла та критерій Даннета. Оцінку «нульових» гіпотез здійснювали на рівні значущості не більше 0,05 [9].

Результати дослідження та їх обговорення. Суттєвим фактором неспецифічної резистентності організму є фагоцитарна активність клітин, до яких належать гранулоцити. Нейтрофіли представляють першу лінію неспецифічного протимікробного захисту, оскільки першими мобілізуються у вогнище запалення і від їх фагоцитарної активності залежить елімінація активаторів [6]. Під впливом хемотаксичних факторів нейтрофіли першими переміщуються до джерела таких агентів і видаляють їх за допомогою фагоцитозу. Агезія, хемокінез і хемотаксис фагоцитів, вивільнення вмісту гранул, дихальний вибух та метаболічна активність, що супроводжує ці ефекти, можуть бути ініційовані різноманітними біологічними чи хімічними стимула-

До клітинних елементів слизової носу відносяться також натуральні кілерні клітини (NK), які є одним із важливих компонентів клітинного вродженого імунітету. NK клітини виконують цитотоксичні та цитокін-продукуючі функції. Головними функціями NK клітин є розпізнавання та елімінація клітин, інфікованих мікроорганізмами або опсонізованих IgG-антитілами. Ефекторні функції NK клітин включають дегрануляцію азурофільних гранул, де депоновані цитотоксичні білки перфорин, гранізи та гранулізин, та продукцію цитокінів (інтерферонів (IFN) гама (IFN- γ) та альфа (IFN- α), ФНО α , ИЛ-8, ИЛ-5 та ін.) [8].

Інкубація виділених на градієнті густини (1,062–1,064) клітин назального секрету із клітинами-мішенями (клітини лінії Her-2 – раку гортани людини) з наступною спектрофотометрією супернатанту та розрахунком індексу цитотоксичності показали, що експериментальні риніти супроводжуються зниженням активності NK клітин, яке більш виразне при бактеріальній формі (табл. 1).

Застосування гелю «Імбирол» та мазі «Піносол» сприяли підвищенню активності NK клітин, яка вірогідно не відрізнялася від інтактного контролю.

Нормальні антитіла (АТ), до яких належать гемолізину та гетерофільні аглютиніни, відносять до гуморальної ланки неспецифічної резистентності організму. Вони виявляються в низьких титрах у сироватці крові, їх ще називають антитілами інакшої специфічності, синтез яких, зазвичай, йде паралельно індукції специфічних антитіл. Хоча активація кожного з клону клітин, які утворюють антитіла інакшої специфічності, йде в малих об'ємах, в сумі вони дають звичайно велику частину імуноглобулінів, що синтезуються.

Таблиця 1.

Показники активності натуральних кілерів в інтраназальному змиві щурів із експериментальним ринітом та за умов лікування «Імбиролом», 14 день ($\bar{X} \pm S_x$, n=10)

| Група тварин | Індекс цитотоксичності NK, % | Група тварин | Індекс цитотоксичності NK, % |
|---|------------------------------|--|------------------------------|
| I – інтактні щури | 36,2 \pm 7,8 | I – інтактні щури | 36,2 \pm 7,8 |
| II – контрольна патологія (хімічний риніт) | 29,1 \pm 7,9* | II – контрольна патологія (бактеріальний риніт) | 24,6 \pm 7,8* |
| III – щури з експериментальним хімічним ринітом + «Імбирол» | 38,7 \pm 5,2# | III – щури з експериментальним бактеріальним ринітом + «Імбирол» | 39,1 \pm 8,1# |
| IV – щури з експериментальним хімічним ринітом + «Піносол» | 37,9 \pm 6,1# | IV – щури з експериментальним бактеріальним ринітом + «Піносол» | 39,0 \pm 7,2# |

Примітки: 1. * – $p < 0,05$ у порівнянні з показником в групі інтактних тварин; 2. # – $p < 0,05$ у порівнянні з показником в групі контрольних тварин; 3. n – кількість тварин у групі.

ми. У зв'язку з важливою роллю фагоцитозу є важливим визначення показників цієї ланки неспецифічної імунної відповіді при ринітах різної етіології [4].

Попередніми дослідженнями нами було встановлено, що бактеріальний риніт супроводжувався більш значною метаболічною активністю нейтрофілів, ніж хімічний, що свідчить про інтенсивніший запальний процес, та, можливо, деструктивні процеси в результаті дихального вибуху нейтрофілів при даній формі риніту і посиленні процесів ПОЛ. Введення «Імбирол» та препарату порівняння «Піносол» сприяли зменшенню проявів запалення і нормалізації метаболічної та функціональної активності фагоцитів.

Частина пулу подібних АТ синтезується паралельно з утворенням специфічних АТ. Ці АТ низькоспецифічні, але здатні перехресно реагувати з широким спектром антигенів. Природні АТ викликають аглютинацію бактерій, їх руйнування (в присутності комплекменту), нейтралізують віруси і токсини, а також стимулюють фагоцитарні реакції (через опсонізацію збудників). Це обумовлює постійну присутність в організмі невеликих кількостей нормальних (природних) антитіл фактично до всіх існуючих антигенів. Їх наявність є показником ступеню імунологічної зрілості організму та нормального функціонування імунної системи [1]. При імунодефіцитних та інших патологічних станах організму титри цих антитіл можуть бути різко зниженими або навіть не виявлятися [2]. Тому визначення природних антитіл різної специфічності є важливим для оцінки впливу на організм різних чинників, хімічних чи біологічних.

Визначення антитіл гемолізину та гетерофільних аглютинінів в сироватці крові щурів із експериментальним ринітом показало, що патологічний процес

Таблиця 2.

Показники рівня гемолізину та гетерофільних аглютининів в сироватці крові щурів із експериментальним ринітом та за умов лікування «Імбирол», 14 день ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$, n=10)

| Група тварин | ГЛ, титр | ГА, титр | Група тварин | ГЛ, титр | ГА, титр |
|---|-----------------------|-----------------------|--|----------|----------|
| I – інтактні щури | 4,6±0,5 | 2,5±0,3 | I – інтактні щури | 4,6±0,5 | 2,5±0,3 |
| II – контрольна патологія (хімічний риніт) | 3,8±0,5 ^{a)} | 1,9±0,3 ^{a)} | II – контрольна патологія (бактеріальний риніт) | 3,6±0,3* | 1,6±0,4* |
| III – щури з експериментальним хімічним ринітом + «Імбирол» | 5,0±0,3# | 2,8±0,5# | III – щури з експериментальним бактеріальним ринітом + «Імбирол» | 4,8±0,3# | 3,3±0,5# |
| IV – щури з експериментальним хімічним ринітом + «Піносол» | 5,1±0,5# | 2,7±0,4# | IV – щури з експериментальним бактеріальним ринітом + «Піносол» | 4,7±0,4# | 3,4±0,4# |

Примітки: 1. * – $p < 0,05$ у порівнянні з показником в групі інтактних тварин; 2. # – $p < 0,05$ у порівнянні з показником в групі контрольних тварин; 3. ^{a)} – тенденція ($1 > p > 0,05$) у порівнянні з показником в групі інтактних тварин; 4. n – кількість тварин у групі; 5. ГЛ – гемолізину; 6. ГА – гетерофільні аглютиніни.

в носі, викликаний хімічним та комбінованим хімічним і бактеріологічним факторами, супроводжувався зниженням рівня природних антитіл (табл. 2).

Отримані дані вказують на те, що, не зважаючи на місцеву травму та місцеве запалення, в крові також спостерігаються зміни вроджених факторів гуморального імунітету. Слід відзначити, що зниження титру антитіл при хімічному риніті носили характер тенденції, тоді як при бактеріальному риніті зміни були вірогідні. Терапія із застосуванням гелю «Імбирол» та мазі «Піносол» сприяли нормалізації показників, які вірогідно не відрізнялися від інтактного контролю.

Таким чином, дослідження місцевого імунітету слизової носу та гуморального вродженого імунітету за показниками крові у щурів з хімічним та бактеріальним ринітами встановили зміни імунологічних показників, які свідчать про пригнічення як клітинних, так і гуморальних факторів. Для самостійного відновлення функції слизової носу необхідний більш тривалий час. У той же час, застосування гелю «Імбирол» та мазі «Піносол» сприяло активації факторів імунологічного захисту організму тварин, про що свідчить нормалізація показників гуморального захисту (природних антитіла в сироватці крові), та активності натуральних кілерних клітин.

Висновки

1. Моделювання хімічного та бактеріального ринітів у щурів достовірно приводило до порушення стану імунологічної резистентності в умовах експериментального гострого риніту на системному рівні за рахунок зменшення NK при хімічному риніті на 19,6% та при бактеріальному на 32% зменшення гемолізину на 24% та на 21,7% відповідно навіть на 14 добу експерименту.

2. Застосування гелю «Імбирол» при хімічному і бактеріальному ринітах достовірно приводило до відновлення показників порушеної імунологічної резистентності на системному рівні за рахунок збільшення концентрації NK, гемолізину, гетерофільних аглютининів.

3. Ефективність нового гелю «Імбирол» має більш позитивну динаміку відновлення порушеного стану імунологічної резистентності у сироватці крові при розвитку експериментальних ринітів та достовірно не відрізнялася від показників мазі «Піносол».

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дозволяють продовжити дослідження переробку експериментальних ринітів, механізмів розвитку захисту та відновлення тканин за умов фармакологічного впливу дослідного гелю «Імбирол».

Література

1. Brugman S, Perdijk O, van Neerven RJ, Savelkoul HF. Mucosal Immune Development in Early Life: Setting the Stage. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2015;63(4):251-68.
2. Camp JV, Jonsson CB. A Role for Neutrophils in Viral Respiratory Disease. *Frontiers in Immunology*. 2017;8:550.
3. Campbell EL, Kao DJ, Colgan, SP. Neutrophils and the inflammatory tissue microenvironment in the mucosa. *Immunological Reviews*. 2016;273(1):112-20.
4. Cho SH, Oh SY, Lane AP, Lee J, Oh MH, Lee S, et al. Regulation of nasal airway homeostasis and inflammation in mice by SHP-1 and Th2/Th1 signaling pathways. *PLoS One*. 2014;9(8):1036-45.
5. Choi JG, Jin YH, Lee H, Oh TW, Yim NH, Cho WK, et al. Protective Effect of Panax notoginseng Root Water Extract against Influenza A Virus Infection by Enhancing Antiviral Interferon-Mediated Immune Responses and Natural Killer Cell Activity. *Frontiers in Immunology*. 2017;8(11):1542-62.
6. Valnes K, Brandtzaeg P, Elgjo K, Stave R. Specific and nonspecific humoral defense factors in the epithelium of normal and inflamed gastric mucosa. Immunohistochemical localization of immunoglobulins, secretory component, lysozyme, and lactoferrin. *Gastroenterology*. 1999;86(3):402-12.
7. Goto Y, Kurashima Y, Kiyono H. Roles of the gut mucosal immune system in symbiosis and immunity. *Rinsho Ketsueki*. 2015;56(10):2205-12.
8. Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *Journal of Immunological Methods*. 2013;168(4):1796-803.
9. Stefanov AV, редактор. *Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv: metod. Rekomendatsii*. K.: Avitsenna; 2002. s. 116-7. [in Russian].
10. Men'shikov VV, редактор. *Laboratornye metody issledovaniya: spravochnik*. Moskva: Meditsina; 1987. s. 155-68. [in Russian].

СТАН КЛІТИННОЇ ТА ГУМОРАЛЬНОЇ ЛАНОК ІМУНІТЕТУ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РИНІТУ ТА ЙОГО ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОРЕКЦІЇ

Крижна С. І., Київська Ю. О., Козар В. В.

Резюме. Проведено один з етапів патофізіологічного дослідження стану місцевого імунітету слизової носу і гуморального вродженого імунітету за показниками крові у щурів з хімічним і бактеріальним ринітом. Моделювання ринітів достовірно призводило до порушення стану імунологічної резистентності на системному

рівні за рахунок зменшення натуральних кілерів при хімічному риніті на 19,6% і при бактеріальному на 32%, зменшення гемолізину на 24% і на 21,7% відповідно навіть на 14 добу експерименту. Доведено на моделі хімічного і бактеріального ринітів, що застосування гелю «Імбирол» достовірно призводило до відновлення показників імунологічної резистентності на системному рівні за рахунок збільшення концентрації НК, гемолізину, гетерофільних аглютинінів. Отримані результати дозволяють продовжити дослідження перебігу експериментальних ринітів, механізмів розвитку захисту і відновлення тканин в умовах фармакологічного впливу дослідницького гелю «Імбирол».

Ключові слова: риніт, гель, імунологія.

СОСТОЯНИЕ КЛЕТОЧНОГО И ГУМОРАЛЬНОГО ЗВЕНЬЕВ ИММУНИТЕТА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО РИНИТА И ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

Крыжная С. И., Киевская Ю. А., Козар В. В.

Резюме. Проведен один из этапов патофизиологического исследования состояния местного иммунитета слизистой носа и гуморального врожденного иммунитета по показателям крови у крыс с химическим и бактериальным ринитами. Моделирование ринитов достоверно приводило к нарушению состояния иммунологической резистентности на системном уровне за счет уменьшения натуральных киллеров при химическом рините на 19,6% и при бактериальном на 32%, уменьшение гемолизинов на 24% и на 21,7% соответственно даже на 14 сутки эксперимента. Доказано на модели химического и бактериального ринитов, что применение геля «Имбирол» достоверно приводило к восстановлению показателей иммунологической резистентности на системном уровне за счет увеличения концентрации НК, гемолизинов, гетерофильных агглютининов. Полученные результаты позволяют продолжить исследования течения экспериментальных ринитов, механизмов развития защиты и восстановления тканей в условиях фармакологического воздействия исследовательского геля «Имбирол».

Ключевые слова: ринит, гель, иммунология.

STATUS OF THE CELLULAR AND HUMORAL LUMP OF IMMUNITY IN THE EXPERIMENTAL RHINITIS AND ITS PHARMACOLOGICAL CORRECTION

Kryzhna S. I., Kievskaya Yu. O., Kozar V. V.

Abstract. Studying the mechanisms of local nasal mucus immunity, which are primarily included in the protection of the body from various nasal antigenic influences, will not only more fully reflect the pathogenesis of diseases, but also develop rational methods of therapy and prevention using the example of a complex gel of local action "Imbirol" containing a complex of essential oils (ginger, muskad salad, marjoram and tea tree).

The purpose of the work was to investigate immunological resistance in the conditions of experimental rhinitis and its pharmacological correction on the basis of the Central Research Laboratory of the NFaU. The research was conducted on the model of acute inflammation of the nasal cavity caused by caustic soda and infected with *S. aureus*. Experimental groups were treated for 14 days in a row with the gel "Imbirol" and "Pinosol". The immunological parameters were determined in the blood: the activity of natural killer cells, the heterophilic agglutinins and hemolysins. The study of local nasal mucosal immunity and humoral innate immunity according to blood parameters in rats with chemical and bacterial rhinitis has been shown to modify the immunological parameters that indicate the suppression of both cellular and humoral factors. For a self-renewal of the function of the nasal mucosa requires a longer time. At the same time, the use of the gel "Imbirol" and the "Pinosol" contributed to the activation of the immunological protection of the organism of animals, as evidenced by the normalization of indicators of humoral protection (natural antibodies in the blood serum) and the activity of natural killer cells.

Simulation of chemical and bacterial rhinitis in rats significantly reduced the state of immunological resistance in the conditions of experimental acute rhinitis at the system level by reducing NK in chemical rhinitis by 19.6% and by bacterial reduction of hemolysins by 32% by 24% and by 21.7%, respectively, even on the 14th day of the experiment. The use of the gel "Imbirol" in chemical and bacterial rhinitis reliably led to the restoration of indicators of impaired immunological resistance at the system level by increasing the concentration of NK, hemolysins, heterophilic agglutinins.

The effectiveness of the new gel "Imbirol" has a more positive dynamics of the restoration of an impaired state of immunological resistance in serum in the development of experimental rhinitis and does not significantly differ from the indicators of the "Pinosol". The obtained results allow to continue the study of the course of experimental rhinitis, the mechanisms of protection and restoration of tissues under the conditions of pharmacological influence of the experimental gel "Imbirol".

Key words: rhinitis, gel, immunology.

Рецензент – проф. Безшапчний С. Б.

Стаття надійшла 03.05.2018 року