УДК 616-035:616-037:615.074

ОПТИМИЗАЦИЯ КРИТЕРИЕВ ДИАГНОСТИКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

[1]Плехова Н.Г., [1]Кондрашова Н.М., [1]Невзорова В.А., [2]Сомова Л.М.

[1]ГБОУ ВПО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, Владивосток, pl_nat@hotmail.com;

[2]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова» СО РАМН, Владивосток

Клеточные факторы неспецифической защиты организма, которые, прежде всего, характеризуются показателями функциональной активности нейтрофилов и макрофагов, оказывают влияние на каскад реакций, связанных с проявлением специфического иммунного ответа. В статье показано, что комплексные исследования фагоцитарной и ферментативной активности клеток врожденного иммунитета, основанные как на исходном определении их состояния, так и на оценке способности клетки под влиянием стимулятора к активации позволяют выявить их резервные возможности. Полученные данные позволяют рассматривать предложенный авторами показатель резервных возможностей фагоцитов местного иммунитета в качестве прогностического критерия течения заболеваний. Помимо этого, приведен пример определения указанного показателя с целью оценки эффективности воздействия фармакологического препарата на местные факторы защиты организма человека.

Ключевые слова: клетки врожденного иммунитета, фагоцитоз, ферменты, праймирование, местные факторы защиты

OPTIMIZATION OF DIAGNOSTIC CRITERIA FOR FUNCTIONAL CONDITION OF CELLS INNATE IMMUNITY

[1]Plekhova N.G., [1]Komdrashova N.M., [1]Nevzorova V.A., [2]Somova L.M.

[1]Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: pl_nat@hotmail.com;

[2]FGBU «Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology n.a .G.P. Somov» SB RAMS, Vladivostok

The cellular factors of nonspecific defense, which is primarily characterized by the functional activity of neutrophils and macrophages, influence on cascade of reaction associated with the expression of specific immune response. In paper the determination of the reserve capacity cells innate immunity on the basis of the complex estimation phagocytic and enzymatic activity in the initial and activated under the influence of stimulants conditions were presented. These data allow the authors to consider the proposed criterion of reserve capacity phagocytes local immunity as a predictor of the disease. In addition, an example of indicated criteria to assess the influence of effects drug on local factors of protection human organism was presented.

Keywords: cells innate immunity, phagocytosis, enzymes, priming, local factors of protection

Клеточные факторы неспецифической защиты организма, которые, прежде всего, характеризуются показателями функциональной активности нейтрофилов и макрофагов, оказывают влияние на каскад реакций, связанных с проявлением специфического иммунного ответа. Известно, что в зависимости от того какая клетка, нейтрофил или макрофаг, будут являться ключевыми в определенный временной промежуток, в дальнейшем определяется направление иммунного ответа организма [9]. Причем, в силу быстрой реакции этих клеток в ответ на нарушение гомеостаза, их функциональная характеристика при различных патологических состояниях организма представляет особое прогностическое значение для определения как наличия патогена в организме, так и степени тяжести течения заболевания им вызываемого.

Многочисленные исследования иммунного статуса больных при различных патологиях доказывают влияние факторов как инфекционной, так неинфекционной природы на активность клеток врожденного защиты, но, к сожалению, работ, посвященных комплексному анализу функциональной активности этих клеток немногочисленно. Предлагаемые доступные методы исследования антиинфекционной резистентности организма дает возможность неполной оценки степени реактивности и повреждения клеток иммунофагоцитарной системы в патологическом процессе. Преимущественно, при исследовании фагоцитоза, определяется поглотительная активность либо нейтрофилов, либо моноцитов, при этом обнаруживаются противоречивые сведения, как о высоких, так и о низких показателях у взрослых и детей [3, 4]. Тогда как, установлено, что завершенность фагоцитоза отмечается при ограниченном интервале доз инфекционной нагрузки, так как слишком малые или, напротив, сильные

воздействия могут оказать не в должной мере влияние на клетки [8]. Так, при низком соотношении микроб/фагоцит реакция почти отсутствует, а при избытке бактерий, когда фагоцит поглощает максимальное их количество, происходит гиперактивация его ферментных систем. В результате разрушаются не только микробы, но и сама клетка, и факторы бактерицидности попадают во внеклеточное пространство, индуцируя, таким образом, новую волну ответной реакции. Необходимо также отметить, что рекомендуемые методы контроля состояния иммунитета организма фиксируют в основном системные нарушения [2, 7]. В свою очередь, оценка состояния местного иммунитета может служить критерием эффективности этиопатогенетической терапии и позволяет получить информацию не только о возбудителях инфекций, но и о характере, выраженности и динамике воспалительного процесса [1].

Цель работы – оптимизировать оценку состояния клеток врожденного иммунитета путем исследования комплекса показателей функциональной активности клеток очага воспаления.

Материалы и методы исследования

Обследовано 87 больных, госпитализированных по поводу внебольничной пневмонии (ВП) и острого бронхита, и 20 здоровых добровольцев (группа контроля). Все пациенты были лицами мужского пола в возрасте 18–21 года, находящиеся в условиях организованных коллективов. Диагноз внебольничной пневмонии устанавливался на основании общепринятых критериев [4]. Оценка тяжести состояния больных на момент поступления проводилась по критериям, предложенным Л.И. Дворецким. Всем пациентам в первый день поступления в стационар назначалась стандартная, в соответствии с существующими рекомендациями, антибактериальная терапия (АБТ). Изучалось морфофункциональное состояние клеток индуцированной мокроты (ИМ), забор которой производили с помощью ультразвукового небулайзера в день поступления и на 10-й день терапии [1]. Концентрацию клеток ИМ доводили до 2×10^6 кл/мл и разносили по 100 мкл в лунки плоскодонных иммунологических планшетов, инкубировали в течение 45 мин для адгезии клеток, после чего удаляли неадгезированные клетки.

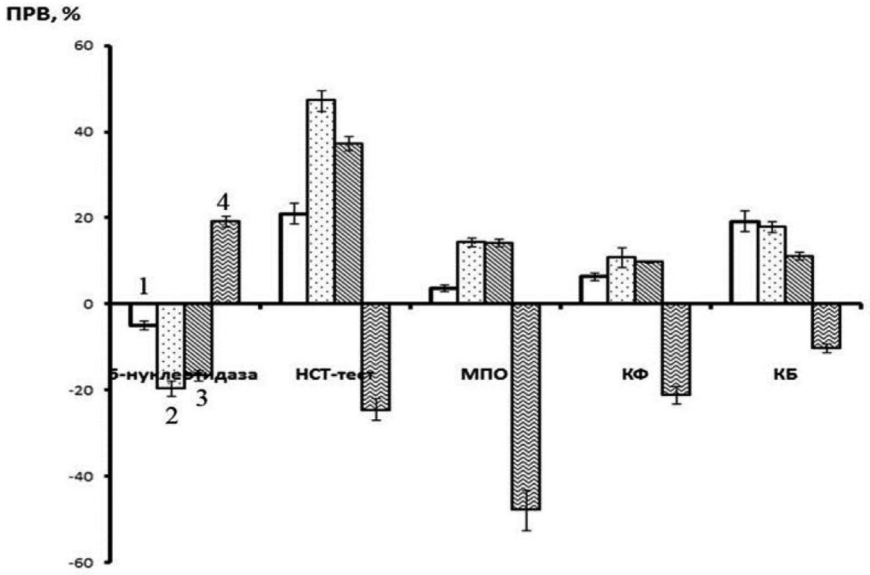
Функциональное состояние клеток определяли по пяти показателям: тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), активность ферментов миелопероксидазы (МПО), кислой фосфатазы (КФ) и 5/-нуклеотидазы – фермента плазматической мембраны клеток, а также определяли внутриклеточное содержание неферментных катионных белков (КБ) [6]. Количество продуктов реакции выявляли по величине оптической плотности на спектрофотометре «Labsystem Multiscan RC» (Финляндия) при соответствующих для определяемых субстратов длинах волн. Также выявляли функциональное состояние клеток врожденного иммунитета путем определения показателя их резервных возможностей (ПРВ). Для чего дополнительно проводили стимуляцию клеток добавлением бактерий, в соотношении 1:10, и инкубировали в течение 30 мин. ПРВ вычисляли по запентованной нами ранее формуле [6]. Для оценки значимости различий показателей использовали парный критерий Т-Вилкоксона для зависимых выборок. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Исследование данных показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток отличается достаточной простотой и скоростью выполнения.

Результаты исследования и их обсуждение

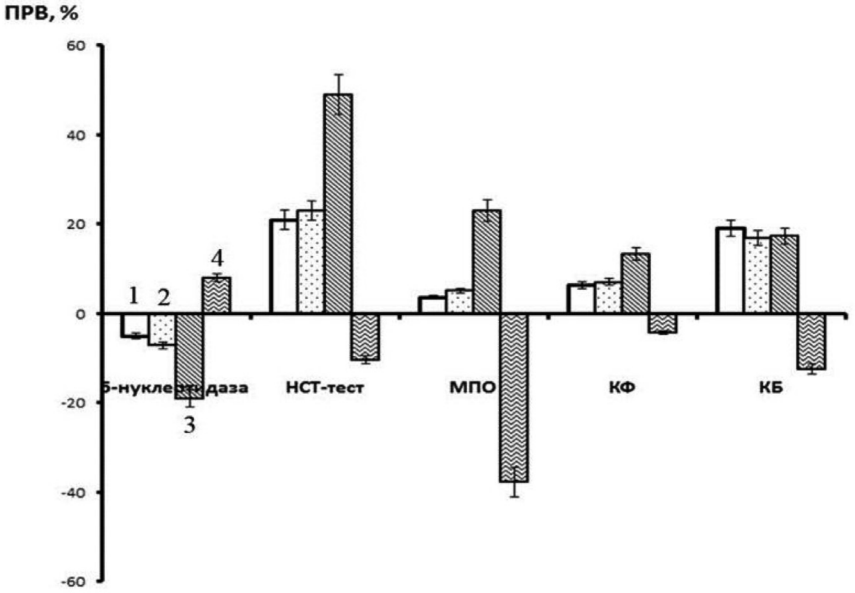
Установлено, что при легком течении ВП метаболическая активность клеток ИМ больных характеризовалась достоверным (по отношению к аналогичному показателю у здоровых добровольцев) увеличением ПРВ, рассчитанным по значениям НСТ-теста, МПО, КФ и снижением ПРВ по активности 5/-нуклеотидазы (рис. 1, а). ПРВ относительно КБ достоверно не отличался от показателей у здоровых добровольцев. Изменения ПРВ клеток ИМ, относительно показателей для фагоцитов ИМ здоровых лиц, отражали их реакцию в ответ на присутствие в очаге воспаления возбудителей заболевания. После проведенной антибактериальной терапии ПРВ фагоцитов в ИМ по значениям НСТ-теста, МПО, КФ имели стойкую тенденцию к снижению, а по 5/-нуклеотидазе ПРВ повысился, и все тестируемые показатели достоверно не отличались от таковых для клеток группы здоровых добровольцев (рис. 1, б). Таким образом, полученные нами данные по изменению ПРВ клеток больных ВП в легкой степени отражали благоприятное течение заболевания при наличии адекватного воздействия антибактериальной терапии на факторы местного иммунитета. В этом случае, наблюдается процесс успешной бактериальной эрадикации в месте воспаления, в условиях которого отпадает необходимость дополнительной активации ферментных систем клеток.

У всех больных со среднетяжелым течением ВП показатели по НСТ-тесту, активности МПО и КФ были достоверно выше, чем у здоровых, тогда как по КБ и 5/-нуклеотидазе отмечено их достоверное снижение (рис. 1, а). Резкое повышение значений ПРВ клеток ИМ после проведения антибиотиковой терапии пациентам, относительно начальных показателей, свидетельствовало об активации фагоцитов (рис. 1, б). Причем ПРВ клеток не достигали соответствующих значений для доноров, что указывало на отсутствие нормализации показателей реактивности фагоцитов местного иммунитета пациентов. В дальнейшем, мы посчитали целесообразным таким пациентам назначить дополнительно, иммунокорри-

гирующую терапию ликопидом, который применяли сублингвально по 1 мг ежедневно утром в течение 10 суток. Известно, что ликопид обладает иммунокорригирующим влиянием на функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагальной системы, повышая или понижая их исходные значения [5]. Определено, что на 10 сутки у пациентов с указанной дополнительной терапией по всем четырем тестируемым параметрам ПРВ клеток достигли соответствующих показателей в группе доноров (рис. 2, а), что свидетельствовало о восстановлении функциональных резервов фагоцитов и, соответственно, нормализации факторов местной защиты легких.

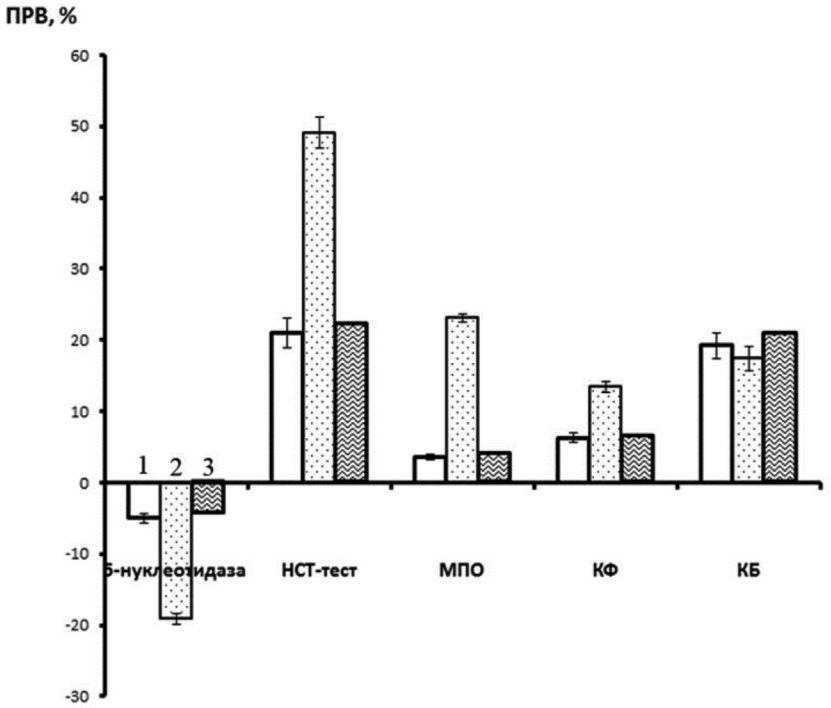


а)

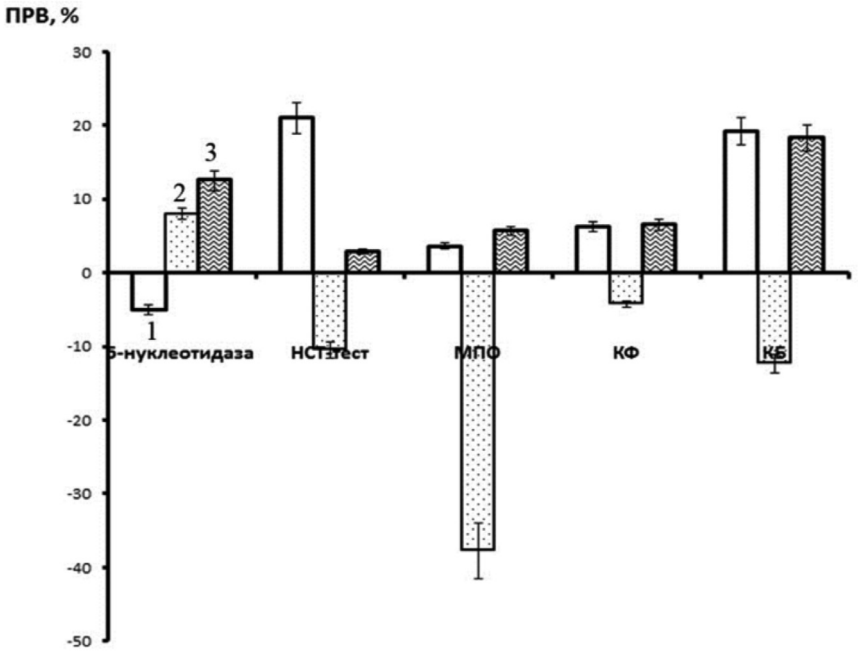


б)

Рис. 1. Показатель резервных возможностей (ПРВ) клеток индуцированной мокроты доноров (1) и больных внебольничной пневмонией легкой (2), средней (3) и тяжелой (4) степени тяжести: а) до начала антибиотиковой терапии; б) после 10 дней лечения



а)



б)

Рис. 2. Показатель резервных возможностей (ПРВ) клеток индуцированной мокроты доноров (1) и больных внебольничной пневмонией средней (а) и тяжелой (б) степени тяжести: 2 – после 10 дней антибиотиковой терапии; 3 – после иммуннокорригирующего лечения

Отрицательная динамика ПРВ клеток по НСТ-тесту, МПО, КФ и, напротив, увеличение по 5/-нуклеотидазе у больных ВП в тяжелой степени свидетельствовала об отсутствии адекватного местного иммунного ответа (рис. 1, а). Причем, у этих пациентов выраженное иммунодефицитное состояние по определяемым показателям фагоцитов

не изменялось на фоне применяемой антибиотиковой терапии. Отмечалось лишь небольшое повышение ПРВ фагоцитов относительно начальных значений (рис. 1, б). При назначении таким пациентам дополнительной иммунотерапии цитокиновым препаратом ронколейкином (активизирует в условии устойчивого иммунодефицитного состояния эффекторные клетки, а ингаляционный способ, по 500 тыс. МЕ одноразово, ежедневно в течение 3 дней, обусловливает прямое воздействие на клетки очага воспаления), обнаружено достоверное повышение ПРВ фагоцитов (рис. 2, б). Указанная положительная динамика ПРВ клеток индуцированной мокроты, на наш взгляд, отражала наличие стимулирующего воздействия ронколейкина на иммунную систему организма. Ронколейкин является генноинженерным аналогом интерлейкина-2, который способствует формированию адекватной иммунореактивности в условиях специфической активации. При индукции способности субпопуляции Th-клеток продуцировать ИФНγ, этот препарат опосредованно влияет на процесс новообразования и дифференцировки клеток врожденного иммунитета, полноценных по функциональному состоянию. Такие клетки способны более активно принимать участие в очищении организма от инфекционного агента.

В силу специфической предназначенности нейтрофилов и макрофагов к быстрой реакции в ответ на внедрение бактерий, исследование их морфофункциональной активности и кооперации при различных состояниях организма имеет прогностическое значение для характеристики гомеостаза, контроля тяжести течения патологических процессов и оценки эффективности лечения больных [7]. Причем, комплексные исследования фагоцитарной и ферментативной активности клеток врожденного иммунитета, основанные как на исходном определении их состояния, так и на оценке способности клетки к активации тех или иных систем под влиянием стимулятора позволяют выявить их резервные возможности. В целом, полученные нами данные, позволяют рассматривать ПРВ фагоцитов местного иммунитета в качестве прогностического критерия течения заболеваний. Помимо этого, при проведении терапии определение ПРВ клеток позволяет оценить эффективность воздействия фармакологического препарата на местные факторы защиты организма человека.

Исследование выполнено соответственно государственному заданию Министерства здравоохранения Российской Федерации «Создание экспериментальных образцов изделий медицинского назначения, лекарственных препаратов» ГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России на 2015-2017 гг.

Список литературы

1. Исследование индуцированной мокроты при заболеваниях органов дыхания: Учебно-методическое пособие для врачей / В.А. Невзорова, С.А. Пазыч, Е.Н. Коновалова и др. – Владивосток: Медицина ДВ, 2003. – С. 14–16.

2. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). – М.: Медицинская книга, 2003. – 443 с.

3. Особенности иммунных нарушений при внебольничных пневмониях // Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Тюрина Е.Б. и др. // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 6. – С. 605–612.

4. Окороков А.Н. Диагностика болезней органов дыхания. – М.: Медицинская литература, 2000. – 448 с.

5. Перова Н.Ю., Виниченко Е.Л., Бондаренко Н.А. Изучение иммунотропного эффекта препарата ликопид в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 3 – С. 639–642.

6. Патент РФ № 9. Сомова Л.М., Плехова Н.Г., Кондрашова Н.М. и др. Способ оценки действия фармакологических препаратов на местные факторы защиты организма на примере бронхолегочных заболеваний // Патент России № 23376620. 2008. Бюл. № 31.

7. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. Норма и патология: Учебник. – 3-е изд. – М: Медицина, 2010. – 752 с.

8. Immunity to salmonellosis // Dougan G., John V., Palmer S., Mastroeni P. // Immunol. Rev. – 2011. – Vol. 240(1) – P. 196–210.

9. Newton K. Signaling in innate immunity and inflammation / K. Newton, V.M. Dixit // Cold. Spring Harb. Perspect. Biol. – 2012. – Vol. 1;4 (3).