

Фактори природженого і антивірусного імунітету в ротоглотковому секреті, екстрактах тканин та лізатах клітин піднебінних мигдаликів дітей при їхній гіпертрофії та хронічному запаленні

О.Ю. Бредун¹, О.Ф. Мельников², М.Д. Тимченко², І.В. Фараон²

¹Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України, Київ;

²ДУ «Інститут отоларингології імені проф. О.С. Коломийченка НАМН України», Київ;
e-mail: alexbredun@gmail.com, elenamelnikova@gmail.com

Досліджували вміст дефензину- β , α - і γ -інтерферонів, антитіл до вірусу грипу А та вірусу Епіштейн–Барр (ЕБВ) у лізатах з клітин піднебінних мигдаликів (ЛМ), в екстрактах з цілих мигдаликів (ЕМ) та в ротоглотковому секреті 21 дитини з гіпертрофією піднебінних мигдаликів і хронічним тонзилітом. Вміст дефензину- β у ротоглотковому секреті був нижчим у пацієнтів з хронічним тонзилітом порівняно зі значеннями при гіпертрофії піднебінних мигдаликів та контролем. Вміст α -інтерферону в ротоглотковому секреті був вищим у пацієнтів як з гіпертрофією піднебінних мигдаликів, так і з хронічним тонзилітом, ніж у контрольній групі, а γ -інтерферону – нижчим у хворих на хронічний тонзиліт відносно значень у пацієнтів з гіпертрофією піднебінних мигдаликів та контролем. Концентрація інтерферонів в ЕМ у 2 рази перевищувала таку в ЛМ та в 3-4 рази – в ротоглотковому секреті. Вміст антитіл до вірусу грипу А не мав достовірної різниці в ЕМ як при гіпертрофії піднебінних мигдаликів, так і хронічному тонзиліті, а в ЛМ обох груп був на межі чутливості методу. Антитіла класу IgM до ЕБВ виявлялися тільки в ЕМ при гіпертрофії піднебінних мигдаликів і при хронічному тонзиліті, в ЛМ антитіл щодо класу вірусу не виявлено. Результати нашого дослідження свідчать про більш низький імунологічний потенціал тканини піднебінних мигдаликів у разі хронічного тонзиліту.

Ключові слова: піднебінні мигдалики; гіпертрофія; хронічний тонзиліт; лізат, екстракт, ротоглотковий секрет, цитокіни, інтерферони.

ВСТУП

Вважається клінічно доведеним і експериментально обґрунтованим, що структури лімфоглоткового кільця Вальдейера–Пирогова істотно впливають на формування місцевого гуморального імунітету, як у ділянці носо-, так і ротоглотки, де переважним гуморальним фактором захисту є секреторний імуноглобулін А (sIgA). Частина антитіл цього класу має високу віруснейтралізуючу активність. Однак відомо, що противірусна дія секретів верхніх дихальних шляхів зумовлена й іншими факторами, наприклад, дефензинами і цитокінами, перш за все інтерферонами.

Значення структур лімфоглоткового кільця у виробленні інтерферонів як противірусних факторів досліджено недостатньо. Є окремі повідомлення про те, що клітини мигдаликів дітей, хворих на хронічний тонзиліт, слабо продукують інтерферони в культурі [1, 2] та мають низьку щільність до їх рецепторів [3]. Важливим доказом участі структур глоткового кільця в здійсненні противірусного захисту є дані про те, що у дітей зі збереженими мигдаликами нижча захворюваність у період інфікування різними типами вірусів [4]. У зв'язку з викладеним доцільним є подальше дослідження механізмів противірусного за-

© О.Ю. Бредун, О.Ф. Мельников, М.Д. Тимченко, І.В. Фараон

хисту, які реалізуються в структурах лімфоглоткового кільця.

Мета нашої роботи – порівняння вмісту дефензину- β , α - і γ -інтерферонів, антитіл до вірусу грипу А та вірусу ЕБВ, у клітинах піднебінних мигдаликів, в екстрактах з цілих мигдаликів, в ротоглотковому секреті дітей з гіпертрофією піднебінних мигдалин і хронічним тонзилітом.

МЕТОДИКА

Визначали вміст дефензину- β , антитіл до вірусу грипу А і ЕБВ, α - і γ -інтерферонів у рідині зруйнованих клітин мигдаликів – лізаті, в екстрактах з «сирої» тканини мигдаликів, в ротоглотковому секреті дітей віком від 5 до 12 років, яких розподілили на 3 групи. До I контрольної групи ввійшли практично здорові діти ($n = 9$) зі збереженими мигдаликами, які не хворіли на ангіну останні 3 роки. До дослідних груп (II і III) ввійшли пацієнти з гіпертрофією піднебінних мигдаликів 2-3-го ступенів ($n = 11$) і з хронічним тонзилітом ($n = 10$) відповідно. В I групі досліджували тільки ротоглотковий секрет, у II і III групах ще і екстракт (ЕМ) та лізат піднебінних мигдаликів (ЛМ).

Клітини отримували зі шматочків піднебінних мигдаликів механічно, з наступним фільтруванням через нейлонове сито і не пізніше ніж через годину після проведених операцій (тонзилотомія або тонзилектомія) та зберігали на холоді (4°C). Готували екстракт мигдаликів на 0,85%-му розчині NaCl у співвідношенні 1:5. Техніка приготування суспензій клітин, отримання лізатів і екстрактів виконана згідно з рекомендаціями Мельникова [5]. Роботи з забору, обробки ротоглоткового секрету проводили відповідно до методичних рекомендацій Інституту отоларингології НАМН України [6]. У рідкій фазі ротоглоткового секрету, лізатах і екстрактах з піднебінних мигдаликів дітей з гіпертрофією і хронічним тонзилітом імуноферментним методом визначали вміст інтерферонів α і γ , дефензину- β [7, 8].

Антитіла до вірусу грипу А в зазначених середовищах вивчали за реакцією гальмування гемаглютинації, використовуючи як вірусний аглютинін протигрипозну вакцину «Ваксигрип» (Франція) в субаглютинуючому титрі [9]. Антитіла до капсидного антигена ЕБВ класу IgM визначали імуноферментним методом (в умовних одиницях оптичної щільності), використовуючи набори реактивів ТОВ «ІВК Ramintek» (Україна). Статистичну обробку результатів проведено з використанням непараметричного критерію U Манна-Уїтні [10] в програмі WinPEPI.

При виконанні експериментів дотримувалися принципів біоетики та законодавчих норм та вимог Гельсінкської декларації (2000), Конституції (1996) та Цивільного кодексу України (2006), Основ законодавства України про охорону здоров'я (1992), Наказу МОЗ України № 66 «Про затвердження порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань і типового положення про комісію з питань етики» (2006), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), що підтверджено відповідним висновком етичного комітету НМАПО імені П.Л. Шупика (2015).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст дефензину- β у ротоглотковому секреті був достовірно нижчим у пацієнтів з хронічним тонзилітом, ніж з гіпертрофією піднебінних мигдаликів та контрольною групою. У ЛМ він був нижчим, ніж в ротоглотковому секреті і не відрізнявся між групами обстежуваних. В ЕМ у пацієнтів з гіпертрофією піднебінних мигдаликів вміст дефензину- β був вищим, ніж у хворих на хронічний тонзиліт і не відрізнявся від вмісту в ротоглотковому секреті здорових донорів (табл. 1).

Вмісту α - і γ -інтерферонів у ротоглотковому секреті в осіб контрольної групи достовірно не відрізнялися між собою (рис. 1). Вміст α -інтерферону був вищим ($P < 0,05$)

Таблиця 1. Вміст дефензину-β (пг/мл) у пацієнтів різних груп

Групи обстежених	Ротоглотковий секрет	Лізат з мигдаликів	Екстракт з мигдаликів
Контроль (n = 9)	6,5 ± 1,94		
Гіпертрофія мигдаликів (n = 11)	5,5 ± 1,57	2,2 ± 1,16	7,0 ± 2,46
Хронічний тонзиліт (n = 10)	3,2 ± 1,47*	2,0 ± 1,33	3,6 ± 2,5**

*P < 0,05 щодо значень у групі з гіпертрофією піднебінних мигдаликів та контролю; **P < 0,05 щодо значень у групі з гіпертрофією піднебінних мигдаликів

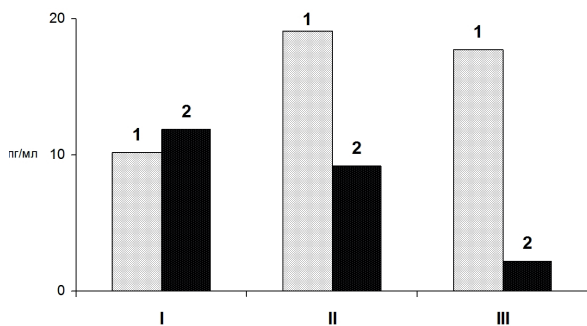


Рис. 1. Вміст α- (1) та γ-інтерферону (2) в ротоглотковому секреті дітей у контрольній групі (I), з гіпертрофією (II) та хронічним тонзилітом (III)

у пацієнтів як з гіпертрофією піднебінних мигдаликів, так і з хронічним тонзилітом, ніж у контролі, а вміст γ-інтерферону був нижчим у ротоглотковому секреті хворих на хронічний тонзиліт (P = 0,02), ніж у пацієнтів з гіпертрофією піднебінних мигдаликів та контрольній групі.

У ЛМ у пацієнтів з хронічним тонзилітом обидва види інтерферонів виявлені в (P < 0,05) меншій кількості, ніж в лізатах клітин мигдаликів у пацієнтів з гіпертрофією. В ЕМ пацієнтів обох груп вміст α- і γ-інтерферонів достовірно не відрізнявся. Концентрація

інтерферонів в ЕМ у 2 рази перевищувала таку в ЛМ, та в 3-4 рази – в ротоглотковому секреті (табл. 2).

Вміст антитіл до вірусу грипу А достовірно не відрізнявся в ЕМ як при гіпертрофії, так і хронічному тонзиліті і в ЛМ обох груп виявлявся на межі чутливості методу (рис. 2). Антитіла класу IgM до ЕБВ визначалися тільки в ЕМ як при гіпертрофії піднебінних мигдаликів, так і при хронічному тонзиліті, в ЛМ антитіл до цього класу вірусу не виявлено (рис. 3).

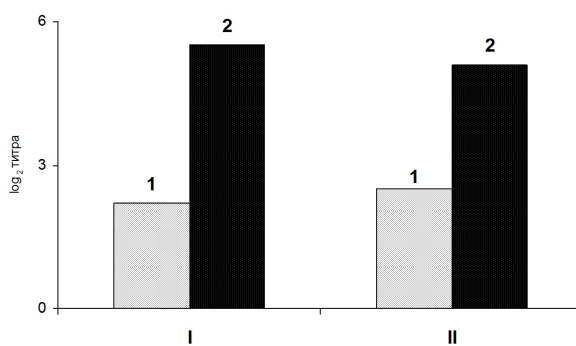


Рис. 2. Вміст антитіл до вірусу грипу А в лізатах піднебінних мигдаликів (1) та екстрактах піднебінних мигдаликів (2) у дітей з гіпертрофією (I) та з хронічним тонзилітом (II)

Таблиця 2. Вміст α-інтерферону та γ-інтерферону (пг/мл) в лізатах і екстрактах піднебінних мигдаликів пацієнтів різних груп

Групи обстежених	Лізат з мигдаликів		Екстракт з мигдаликів	
	α-інтерферон	γ-інтерферон	α-інтерферон	γ-інтерферон
Гіпертрофія мигдаликів (n = 11)	16,5 ± 12,01	36,5 ± 8,58	41,0 ± 4,42	137,8 ± 25,46
Хронічний тонзиліт (n = 10)	6,2 ± 3,04*	11,2 ± 6,4*	50,6 ± 13,65	106,0 ± 19

*P < 0,05 щодо значень у групі з гіпертрофією піднебінних мигдаликів

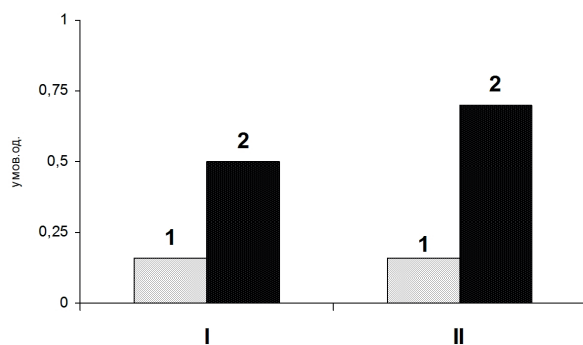


Рис. 3. Вміст антитіл до вірусу Епштейн-Барр (капсидного антигена) в лізатах піднебінних мигдаликів (1) та екстрактах піднебінних мигдаликів (2) у дітей з гіпертрофією (I) та з хронічним тонзилітом (II)

ОБГОВОРЕННЯ

Серед широкого спектра гуморальних факторів вродженого імунітету в захисті слизової оболонки верхніх дихальних шляхів істотне значення, відповідно до даних [11–13], відводиться дефензінам (антимікробним пептидам), які разом з іншими компонентами неспецифічної резистентності забезпечують першу лінію захисту [14]. Зниження концентрації цього фактора в ротоглотковому секреті та екстрактах піднебінних мигдаликів дітей хворих на хронічний тонзиліт може свідчити про його нестачу як компонента імунологічного захисту, а вищий вміст в ЕМ порівняно з ЛМ говорить про позаклітинне походження.

Про зниження захисного протівірусного потенціалу піднебінних мигдаликів при хронічному тонзиліті може вказувати і більш низький вміст обох інтерферонів як в ЛМ, так і в ЕМ, що побічно підтверджує думку деяких авторів про розвиток локального імунодефіциту за умов осередкової інфекції в ділянці верхніх дихальних шляхів [1, 15, 16]. Підвищення вмісту α -інтерферону в ротоглотковому секреті як при гіпертрофії піднебінних мигдаликів, так і при хронічному тонзиліті у дітей може говорити про часте інфікування верхніх дихальних шляхів вірусами або мати екстратонзиллярне походження. Близькі за вмістом у піднебінних мигдаликах дітей при гіпертрофії та хронічному тонзиліті титри

антитіл до вірусу грипу А свідчать, цілком ймовірно, про багаторазове інфікування вірусом верхніх дихальних шляхів і вирівнювання цих показників у тканині мигдаликів під час ремісії. Підводячи підсумок проведеним дослідженням, слід розглядати як правомірні висновки про те, що у разі хронічного тонзиліту тканина піднебінних мигдаликів має більш низький імунологічний потенціал, ніж при їх гіпертрофії, що є підставою для організації імунореабілітаційних комплексних заходів [1, 17, 18]. Проведені дослідження підтверджують та розширюють уявлення про імунофізіологічну значимість лімфоїдної тканини піднебінних мигдаликів у забезпеченні локального як протибактеріального, так і протівірусного імунітету.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

А.Ю. Бредун, О.Ф. Мельников, М.Д. Тимченко, І.В. Фараон

ФАКТОРЫ ВРОЖДЕННОГО И АНТИВИРУСНОГО ИММУНИТЕТА В РОТОГЛОТОЧНОМ СЕКРЕТЕ, ЭКСТРАКТАХ ТКАНИ И ЛИЗАТАХ КЛЕТОК НЕБНЫХ МИНДАЛИН ДЕТЕЙ ПРИ ИХ ГИПЕРТРОФИИ И ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ

Исследовали содержание дефензинов- β , α - и γ -интерферонов, антител к вирусу гриппа А и вирусу Эпштейн-Барр (ЭБВ) в лизатах из клеток небных миндалин (ЛМ), в экстрактах из целых миндалин (ЭМ) и в ротоглоточном секрете 21 ребенка с гипертрофией небных миндалин и хроническим тонзиллитом. Содержание дефензина- β в ротоглоточном секрете было ниже у пациентов с хроническим тонзиллитом по сравнению с больными гипертрофией небных миндалин и контрольной группой. Содержание α -интерферона в ротоглоточном секрете было выше при гипертрофии небных миндалин и при хроническом тонзиллите, чем в контрольной группе, а γ -интерферона – ниже в случае хронического тонзиллита, чем у пациентов с гипертрофией небных миндалин и контрольной группой.

В ЛМ у пацієнтів с хроническим тонзиллитом оба вида интерферонов обнаружены в меньшем количестве, чем в лизатах клеток небных миндалин у больных с гипертрофией. В ЭМ пацієнтів обоих групп содержание α - и γ -интерферонов достоверно не отличалось. Концентрация интерферонов в ЭМ в 2 раза превышала таковую в ЛМ, и в 3-4 раза – в ротоглоточном секрете. Содержание антител к вирусу гриппа А не имело достоверной разницы в ЭМ как при гипертрофии небных миндалин, так и хроническом тонзиллите и в ЛМ обеих групп определялось на грани чувствительности метода. Антитела класса IgM к ЭБВ определялись только в ЭМ и при гипертрофии небных миндалин, и при хроническом тонзиллите, в ЛМ антител к данному классу вируса не обнаружено. Результаты исследований свидетельствуют о более низкий иммунологическом потенциале ткани небных миндалин в случае хронического тонзиллита.

Ключевые слова: небные миндалины; гипертрофия; хронический тонзиллит; лизат, экстракт, ротоглоточный секрет, цитокины, интерфероны.

O.Yu. Bredun¹, O.F. Melnykov², M.D. Timchenko², I.V. Faraon²

FACTORS OF INNATE AND ANTIVIRAL IMMUNITY IN THE OROPHARYNGEAL SECRETION, TISSUE EXTRACTS AND CELL LYSATES OF PALATINE TONSILS IN CHILDREN WITH THEIR HYPERTROPHY AND CHRONIC INFLAMMATION

The authors determined comparative contents of defensin- β , α and γ interferons, antibodies to influenza A virus and Epstein-Barr virus capsid antigen in extracts from tonsil tissue, cell lysate and oropharyngeal secretion in children with tonsil hypertrophy and chronic tonsillitis. Cell lysates and tissue extracts were obtained from palatine tonsils of 21 patients aged 5-12 during appropriate surgical interventions on the tonsils with hypertrophy and chronic tonsillitis. Oropharyngeal secretions were obtained from 9 practically healthy children. The results indicate a significant difference in the level of factors of innate immunity in hypertrophy of the tonsils and chronic tonsillitis. In the tissue and cells of the tonsils with chronic tonsillitis, the content of innate immunity factors (defensins and interferons) is reduced in comparison with hypertrophy of the tonsils. Anamnestic antibodies to influenza A virus and antibodies to EBV are detected in the tissue in the same amount with hypertrophy and chronic tonsillitis. The research results allow us to conclude that under conditions of chronic inflammation, the tissue of the tonsils has lower immunological potential than the tissue of the tonsils with hypertrophy. This forms the basis for organizing immune-rehabilitation complex approaches for the conservative treatment of chronic tonsillitis.

Key words: hypertrophy of the tonsils, chronic tonsillitis, defensin- β , interferon, antibodies to viruses, cell lysate, tissue extract, oropharyngeal secretion.

¹*P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine;*

²*O.S. Kolomyichenko Institute of Otolaryngology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine; e-mail: alexbredun@gmail.com, elenamelnikova@gmail.com*

REFERENCES

1. Melnykov O, Zabolotny D, Kischuk V, Bredun O, Rylska O. Immunology of chronic tonsillitis. Kyiv: Logos; 2017. [Russian].
2. Melnykov O, Bredun O, Timchenko M, Bredun S. Content of afferent and effectors immune system cells, regulatory cytokines of hypertrophy and chronic inflammation palatine tonsils in children were estimated. Fiziol Zh.. 2019; 65(2): 84-8. [Ukrainian].
3. Bernstein J, Rich G, Odzimec C, Ballow M. Are thymus-derived lymphocytes defective un nasopharyngeal and palatine tonsils of children? Head & Neck Surgery. 1994;109(4): 693-700.
4. Layko A, Zabolotny D, Kosakovskiy A, Bereznuk V, Zabolotna D. Hypertrophy of the lymphadenoid tissue of the pharynx. Kyiv: Logos; 2009. [Ukrainian].
5. Melnykov O. Immunological aspects of the genesis of chronic tonsillitis and regulation of the functional activity of the palatine tonsils [dissertation]. Kiev: Institute of Physiology, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR; 1981. [Russian].
6. Zabolotny D, Melnykov O, Timchenko S, Zabolotna D. Study of oropharyngeal secretion in patients with chronic inflammatory and allergic diseases of the upper respiratory tract. Kyiv; Institute of Otolaryngology. 2008. [Ukrainian].
7. Demyanov A, Kotov A, Simbirtsev A. Diagnostic value of clinical cytokine studies. Cytokines and inflammation. 2003; 3: 20-8. [Russian].
8. Henderson C, Goldbach-Mansky R. Monogenic IL-1 mediate inflammatory and deficiency syndromes. Clin Immunol. 2010; 135(3): 210-22.
9. Kabat A, Mayer M. Experimental Immunochemistry. Moscow: World; 1968. [Russian].
10. Gubler E. Informatics in pathology, clinical medicine and pediatrics. Leningrad: Medicine; 1999. [Russian].
11. Abaturon O, Gerasimenko O, Visochina I, Zavgorodnaya N. Defensins and defensin-dependent diseases Odessa: VMV; 2011. [Russian].
12. Melnykov O, Peleshenko N, Zabolotna D, Rylska O. Immunomodulation of phytopreparations in the treatment of inflammatory diseases of the upper respiratory tract. Kiev; 2013. [Russian].
13. Diamond G, Beckloff N, Weinberg A, Kisish K. The role antimicrobial peptides in innate host defense. Curr Parm Des 2009; 15(21): 2377-92.
14. Drannik G. Clinical immunology and allergology. Kyiv: Polygraph plus; 2010. [Russian].
15. Abaturon O, Kruchko T, Agafonova O, Didyatkovskiy B, Ostapenko V, Kolenko I. Pathogenetic bases of development and possibilities of medical correction of

-
- infectious process in pediatric practice. Kyiv: Julia print; 2016. [Ukrainian].
16. Matricon J, Barnish N, Ardid D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*. 2010; 1(4): 299-309.
17. Melnykov O, Zabolotnaya D. Modern approaches to the conservative treatment of chronic tonsillitis. Kiev: Vistka; 2012. [Russian].
18. Windfuhr J, Toepfne N, Steffen G, Waldfahrer F, Berner R. Clinical practice guideline: tonsillitis. 1. Diagnostics and nonsurgical management. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016; 273(b): 974-89.

*Матеріал надійшов
до редакції 19.08.2019*