

7. Лебедев Ю.А., Шабанов Г.А., Рыбченко А.А., Максимов А.Л. Модель активирующей системы пространственной организации биопотенциалов головного мозга: теоретическое и экспериментальное обоснование // *Вестн. СВНЦ ДВО РАН*. 2005. № 1. С. 49–56.
8. Либман Е.С., Чумаева Е.А., Елькина Я.Э. Эпидемиологические характеристики глаукомы // *HRT Клуб России: сб. научных статей*. М., 2006. С. 207–212
9. Машковский М.Д., Рощина Л.Ф. Сравнительное влияние антиглаукоматозных препаратов на биоэлектрическую активность головного мозга // *Фармакология и токсикология*. 1983. Т. 46, № 1. С. 23–28.
10. Сви́дерская Н.Е., Коро́лькова Т.А. Пространственная организация электрических процессов мозга: проблемы и решения // *Журнал высшей нервной деятельности*. 1997. Т. 47, № 5. С. 792–811.
11. Соколов В.А. Особенности функциональной организации центральных отделов вегетативной нервной системы при первичной открытоугольной глаукоме // *Глаукома*. 2001. № 1. С. 8–11.
12. Федотчев А.И., Бондарь А.Т., Акоев И.Г. Ритмическая структура ЭЭГ человека: современное состояние и тенденции исследований // *Успехи физиол. наук*. 2000. Т. 31, № 3. С. 39–53.
13. Шабанов Г.А., Лебедев Ю.А., Рыбченко А.А. Магнитозцефалограф индукционный для функционально-топической диагностики заболеваний внутренних органов // *Альманах клинической медицины: мат. III Троицкой конф. «Медицинская физика и инновации в медицине»*. М., 2008. Т. 17, часть I. С. 252–255.
14. Katz J., Tielsch J.M., Quigley H.A. et al. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020 // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993. Vol. 34, No. 12. P. 3271–3277.

Поступила в редакцию 30.03.2011.

#### SCREENING FOR PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Ya.F. Pestryakova<sup>1</sup>, G.A. Shabanov<sup>2</sup>, V.Ya. Melnikov<sup>3</sup>, A.A. Ryibchenko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medical Association of FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russia), <sup>2</sup>Research Centre 'Arctica' FEB RAS (95 Kirova St. Vladivostok 690022 Russia), <sup>3</sup>Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia)

**Summary** – The paper characterises regularities in changing total bioelectrical activity of brain in case of primary open-angle glaucoma using magnetic encephalography. The authors have examined 30 patients with primary open-angle glaucoma, 30 patients with ocular ischemic syndrome and 30 persons with no eye diseases. The original diagnostic complex MEGI-01 was used to register diffuse rhythmic activity of brain. It allowed detecting changes in the diffuse bioelectrical activity of brain being specific of primary open-angle glaucoma. These were disorders in the functioning of ocular adrenoceptor structures, weakening of the parasympathetic effects on the neuroreceptor apparatus known for abundance and variability of receptor elements concentrated at the boundaries of the ciliary body and drainage zone of the eye. The findings will allow to create correcting matrix designed to normalise vegetative tonus of ocular structures at early stages of glaucoma.

**Key words:** glaucoma, diagnostics, magnetoencephalography.

Pacific Medical Journal, 2012, No. 1, p. 80–83.

УДК 616.24-002-078:612.017.11

## ОПТИМИЗАЦИЯ ОЦЕНКИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЕГКИХ

Н.М. Кондрашова<sup>1</sup>, Н.Г. Плехова<sup>2</sup>, Л.М. Сомова<sup>2</sup>, А.В. Костюшко<sup>1</sup>, Б.И. Гельцер<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Владивостокский государственный медицинский университет (690950 г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

<sup>2</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

**Ключевые слова:** внебольничная пневмония, индуцированная мокрота, иммунотерапия, резервные возможности фагоцитов.

Использован авторский способ оценки функциональной активности клеток врожденного иммунитета в очаге воспаления для оптимизации терапии у пациентов с внебольничной пневмонией. Подтверждено, что для определения состояния тканевого иммунного ответа целесообразно исследовать функциональную активность клеток индуцированной мокроты, как наиболее активно реагирующих на внедрение бактериальных агентов. С целью повышения объективности и достоверности результатов необходимо исследовать комплекс показателей функциональной активности фагоцитов с тестированием их резервных возможностей. Предложенный способ позволяет оценить степень влияния проводимой терапии на состояние местной защиты дыхательной системы и на этой основе дифференцированно подойти к назначению иммуномодулирующих препаратов.

К настоящему времени разработано множество надежных способов определения иммунологических параметров у человека, однако рекомендуемые методы контроля состояния иммунитета фиксируют в основном системные нарушения [4, 10, 11]. Вместе с тем роль топических

факторов защиты в противоинфекционном иммунитете трудно переоценить. Большинство проникающих в органы дыхания бактериальных агентов в локусе воспаления подвергаются утилизации клетками макрофагами и нейтрофилами без заметной стимуляции других звеньев иммунитета [7, 8]. Поэтому для диагностики состояния иммунного ответа при патологии легких целесообразно определять функциональную активность макрофагов и нейтрофилов – клеток врожденного иммунитета из очага воспаления, наиболее чутко реагирующих на различные внешние воздействия. При этом оценка состояния местной иммунной реакции может служить критерием эффективности этиопатогенетической терапии.

Определение показателей функционального состояния иммунитета позволяет оценить устойчивость организма к инфекционным агентам, прогнозировать развитие и течение заболевания [10, 11]. Важнейшей составляющей иммунной системы являются клеточные элементы врожденного иммунитета – основные эффекторы фагоцитоза. Причем в полной мере судить

о толерантности организма человека к бактериальной инвазии на основании тестирования отдельных показателей сложно, так как это не позволяет проследить весь спектр бактерицидных функций фагоцитов [11]. Выявление степени напряженности их функционального состояния в силу быстрой реакции в ответ на внедрение бактерий имеет особенное прогностическое значение. Помимо оценки исходной функциональной активности большое значение в диагностике резервных возможностей имеет выявление характера ответа фагоцитирующих клеток на дополнительную нагрузку, поскольку их способность резко усиливает метаболизм при стимуляции. При этом изменение активности фагоцитов в ответ на внесение стимулирующего агента *in vitro* может служить критерием, позволяющим максимально точно судить о состоянии иммунитета, и прежде всего о резервных возможностях этих клеток.

Учитывая высокую частоту заболеваний легких, антибиотикорезистентность основных возбудителей пневмоний, частое развитие бактериемии и других осложнений на их фоне, необходимо более глубоко изучать эту патологию. В развитии воспаления легких имеют значение не только массивность дозы возбудителя и его вирулентность, но и сниженная противомикробная защита дыхательных путей. Пневмония сопровождается системными реакциями как на уровне периферической крови, так и на уровне бронхоассоциированной лимфоидной ткани, всегда протекает с изменением функциональной активности в субпопуляциях клеток, а также с различными дисфункциями в системе комплемента и фагоцитоза [12].

Несмотря на многочисленные исследования иммунного статуса больных при патологии легких, работ, посвященных комплексному анализу функциональной активности клеточных элементов врожденного иммунитета, здесь практически нет. Преимущественно при анализе фагоцитоза определялась поглотительная активность либо нейтрофилов, либо моноцитов, при этом имелись противоречивые сведения как о высоких, так и о низких показателях у взрослых и детей [2, 6]. Необходимо также отметить, что исследование функционального состояния этих клеток преимущественно проводилось при изучении системных параметров иммунитета, тогда как исследование клеток индуцированной мокроты позволяет получить информацию не только о возбудителях инфекций дыхательных путей, но и о характере, выраженности и динамике воспалительного процесса, которые зависят от состояния клеток местного иммунитета [3].

Цель работы – оптимизировать оценку состояния клеток врожденного иммунитета путем исследования комплекса показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток очага воспаления у пациентов с бронхолегочными заболеваниями.

**Материал и методы.** Обследовано 87 больных, госпитализированных по поводу внебольничной пневмонии (ВП) легкой и средней степени тяжести и 20 здоровых добровольцев-доноров (группа контроля).

Все пациенты были лицами мужского пола в возрасте 18–21 года, находившиеся в условиях организованных коллективов. Диагноз ВП устанавливался на основании общепринятых критериев [1]. Оценка тяжести состояния больных на момент поступления проводилась по Л.И. Дворецкому (1996). Всем пациентам в первый день поступления в стационар назначалась стандартная, в соответствии с существующими рекомендациями, антибактериальная терапия [1].

Пациенты со среднетяжелым течением пневмонии в зависимости от уровня реактивности клеток индуцированной мокроты были разделены на две подгруппы: 1-ю – со сниженными показателями резервных возможностей (ПРВ) фагоцитов и 2-ю – с повышенными параметрами ПРВ фагоцитов. Кроме того, 1-я подгруппа больных была разделена на две равнозначные по численности субподгруппы – А и Б. Пациентам субподгруппы А проводилось стандартное антибактериальное лечение, пациентам субподгруппы Б дополнительно назначалась иммунокорректирующая терапия ликописом (препарат назначали сублингвально по 1 мг ежедневно утром в течение 10 суток).

В качестве материала для исследования использовались фагоцитирующие клетки, извлеченные из индуцированной мокроты больных и доноров-добровольцев. Забор материала проводили в день поступления и на 10-й день лечения. Мокроту получали посредством индукции ее отхождения ингаляцией 3–5% стерильного гипертонического солевого раствора в течение 5–30 мин с помощью ультразвукового небулайзера по методу I. Pin и P.G. Gibson в модификации Т.А. Popov et al. [13, 14]. Отфильтрованную мокроту центрифугировали при 1200 об./мин в течение 10 мин, затем супернатант удаляли, а взвесь фагоцитов промывали три раза сбалансированным солевым раствором Хенкса. В камере Горяева подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток и доводили ее до  $2 \times 10^6$ /мл, затем разносили по 100 мкл в лунки плоскодонных иммунологических планшетов, инкубировали в течение 45 мин для адгезии клеток, после этого удаляли неадгезированные элементы путем двойного промывания теплой средой 199.

Для стимуляции клеток использовали *Staphylococcus aureus*. Для этого в лунки после адгезии лейкоцитов добавляли по 100 мкл рабочего раствора бактерий с концентрацией 20 м.к./мл, в контрольные лунки вносили 100 мкл среды 199. После инкубирования в течение 30 мин надсадок удаляли и клеточный монослой дважды отмывали от непоглощенных бактерий. Монослой высушивали и фиксировали в парах формалина в течение 15 мин, после чего исследовали ферментативную активность клеток.

Цитохимическую активность фагоцитов определяли по пяти показателям: продукция супероксид-аниона в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), активность миелопероксидазы, кислой фосфатазы (КФ) и 5'-нуклеотидазы (фермента цитоплазматической мембраны), внутриклеточное содержание неферментных катионных белков (КБ) [9]. Количество

Таблица 1

Показатели функциональной активности фагоцитов индуцированной мокроты при легком течении пневмонии

Критерий	ПВР фагоцитов, %		
	Контроль	Больные (n=27)	
		до лечения	после лечения
5'-нуклеотидаза	-5,0±0,9	-19,7±1,8 <sup>1</sup>	-7,1±1,3
НСТ-тест	21,0±2,3	47,3±2,4 <sup>1</sup>	23,0±1,7
Миелопероксидаза	3,6±0,8	14,3±1,1 <sup>1</sup>	5,1±0,9
КФ	6,3±0,8	10,7±2,2 <sup>1</sup>	7,1±0,3
КБ	19,2±2,4	17,8±1,2	16,9±0,9

<sup>1</sup> Разница с контролем статистически значима.

продуктов реакции выявляли по величине оптической плотности на спектрофотометре Labsystem Multiscan RC (Финляндия) при соответствующих длинах волн. Исследование данных показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток отличается достаточной простотой и скоростью выполнения.

Для оценки эффективности фармакологических препаратов использовали ПВР фагоцитов, который рассчитывали в процентах по формуле:

$$\text{ПВР} = (\text{ОПР}_{\text{опыт}} - \text{ОПР}_{\text{исх}}) / \text{ОПР}_{\text{исх}} \times 100,$$

где ОПР<sub>опыт</sub> – оптическая плотность суспензии фагоцитов, стимулированных бактериями (OD10<sup>-3</sup>), ОПР<sub>исх</sub> – исходная оптическая плотность суспензии нестимулированных фагоцитов (OD10<sup>-3</sup>) [9].

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 6. Вычисляли среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку. Для оценки значимости различий показателей использовали парный Т-критерий Вилкоксона для зависимых выборок.

**Результаты исследования.** При легком течении ВП метаболическая активность клеток индуцированной мокроты характеризовалась достоверным (по отношению к показателям здоровых) увеличением ПВР, рассчитанным по НСТ-тесту, миелопероксидазе и КФ и снижением – по активности 5'-нуклеотидазы. ПВР фагоцитов относительно КБ достоверно не отличался от нормы. После антибактериальной терапии ПВР фагоцитов по НСТ-тесту, миелопероксидазе и КФ имели стойкую тенденцию к снижению, а по 5'-нуклеотидазе – к повышению. В конце срока наблюдения тестируемые показатели достоверно не отличались от таковых у группы здоровых (табл. 1).

У всех больных со среднетяжелым течением ВП значения ПВР по НСТ-тесту, активности миелопероксидазы и КФ были достоверно выше, чем у здоровых, тогда как по КБ и 5'-нуклеотидазе отмечено их снижение (табл. 2). После лечения у пациентов 2-й подгруппы все изучаемые показатели приблизились к значениям здоровых доноров и достоверно от них не отличались. Функциональную активность фагоцитирующих клеток и их резервные возможности у больных этой подгруппы мы расценили как достаточные и не требующие, кроме стандартной антибактериальной, дополнительной терапии.

Таблица 2

Показатели функциональной активности фагоцитов индуцированной мокроты больных среднетяжелой пневмонией при поступлении

Критерий	ПВР фагоцитов, %		
	Все больные (n=60)	1-я подгруппа (n=38)	2-я подгруппа (n=22)
НСТ-тест	37,3±2,1 <sup>1</sup>	12,0±1,2	49,1±1,8 <sup>1</sup>
Миелопероксидаза	14,1±2,1 <sup>1</sup>	1,3±0,7	23,1±2,2 <sup>1</sup>
КФ	9,7±0,9	3,7±0,7	13,4±0,9 <sup>1</sup>
КБ	11,1±1,6	17,9±1,4	17,4±1,8

<sup>1</sup> Разница с контролем (см. табл. 1) статистически значима.

Таблица 3

Показатели функциональной активности фагоцитов индуцированной мокроты больных среднетяжелой пневмонией после лечения

Критерий	ПВР фагоцитов, %		
	1-я подгруппа		2-я подгруппа (n=22)
	А (n=19)	Б (n=19)	
5'-нуклеотидаза	-1,6±0,7 <sup>1</sup>	-4,3±0,8	-4,2±2,1
НСТ-тест	16,1±1,2 <sup>1</sup>	22,2±1,9	19,1±1,8
Миелопероксидаза	2,1±0,3 <sup>1</sup>	4,1±1,1	3,1±1,2
КФ	5,1±1,1	6,6±0,5	5,4±0,9
КБ	18,9±1,5	20,9±1,4	17,4±1,8

<sup>1</sup> Разница с контролем (см. табл. 1) статистически значима.

Уменьшение ПВР фагоцитов по НСТ-тесту, миелопероксидазе и КФ и, напротив, увеличение по 5'-нуклеотидазе у больных 1-й подгруппы свидетельствовала, по нашему мнению, об отсутствии адекватного местного иммунного ответа. У пациентов субподгруппы А 1-й подгруппы после стандартной антибактериальной терапии значения ПВР по трем параметрам (НСТ-тест, миелопероксидаза и 5'-нуклеотидаза) не достигли показателей здоровых доноров. У пациентов же субподгруппы Б после лечения, дополненного ликопидом, отмечалось достоверное увеличение ПВР фагоцитов, который после лечения не отличался от соответствующего показателя в группе доноров (табл. 3).

**Обсуждение полученных данных.** Исследование позволило установить неравнозначную, разнонаправленную метаболическую активность фагоцитирующих клеток при различной тяжести ВП, а также зависимость показателей функциональной активности этих клеток от проводимой терапии.

Выявленные изменения метаболизма клеток индуцированной мокроты больных при легком течении пневмонии, на наш взгляд, связаны с закономерной активацией фагоцитов на присутствие в очаге воспаления возбудителей заболевания. Характер изменений параметров ПВР клеток у таких больных после антибактериальной терапии свидетельствует о благоприятном течении заболевания, что является косвенным критерием бактериальной эрадикации, в условиях которой отпадает необходимость реализации резервных возможностей фагоцитирующих клеток.

У больных ВП со среднетяжелым течением иммунный ответ характеризовался как умеренным повышением реактивности фагоцитирующих клеток, так и снижением их функциональной активности. Приближение уровня изучаемых показателей к значениям здоровых лиц у пациентов с повышенным уровнем реактивности клеток индуцированной мокроты после традиционного лечения говорит о достаточной активности местного иммунитета на фоне адекватной терапии и не требует, на наш взгляд, дополнительных назначений.

Отсутствие адекватного местного иммунного ответа свидетельствует об истощении резервных возможностей фагоцитирующих клеток. В этих условиях на фоне только антибактериального лечения не происходит восстановления их функциональной активности, что требует, на наш взгляд, назначения иммунокорректирующей терапии дополнительно к стандартной антибактериальной. Выбор препарата должен быть обусловлен его действием на те звенья иммунной системы, в функциональной активности которых выявлены дефекты. Липид оказывает корректирующее влияние на показатели функциональной активности фагоцитов, повышая или понижая их исходные значения, что в конечном итоге приводит их в соответствие с показателями здоровых доноров. Этот препарат прост в применении, не имеет тяжелых побочных эффектов даже при очень высоких дозах (в десятки раз превышающих терапевтические) [5]. После антибактериальной терапии в сочетании с липидом достоверное увеличение ПРВ в сравнении со значениями до начала терапии и с показателями у доноров свидетельствует о восстановлении функциональных резервов иммунных фагоцитов и, соответственно, нормализации факторов местной защиты легких.

Таким образом, анализ динамики показателей резервных возможностей фагоцитирующих клеток локального звена иммунной системы у больных внебольничной пневмонией позволяет в короткие сроки не только объективно оценить эффективность стандартной антибактериальной терапии, но и служить критерием для назначения иммуномодулирующих препаратов.

Преимуществами предложенного способа оценки эффективности воздействия на факторы местной защиты у больных ВП являются:

1. Объективность – проводится комплексная оценка функциональной активности фагоцитов очага воспаления по пяти показателям, что отражает состояние местной защиты дыхательной системы;
2. Возможность непосредственно судить о резервных потенциях клеток врожденного иммунитета путем исследования активности фагоцитов индуцированной мокроты под влиянием стимулирующего агента *in vitro*;
3. Достоверность интерпретации результатов (использование формулы определения ПРВ фагоцитов);
4. Дифференцированный подход к назначению иммуномодулирующих препаратов с учетом исходных показателей резервных возможностей фагоцитов очага воспаления.

## Литература

1. Внебольничные пневмонии у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике / Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский Л.С. и др. М.: М-Вести, 2006. 76 с.
2. Жолондзь Н.Н. Клиника и течение внебольничной пневмонии у людей молодого возраста с дефицитом массы тела: автореф. ... дис. канд. мед. наук. Владивосток, 2003. 22 с.
3. Исследование индуцированной мокроты при заболеваниях органов дыхания: учебно-методическое пособие для врачей // Невзорова В.А., Пазыч С.А., Коновалова Е.Н. и др. Владивосток: Медицина ДВ, 2003. 116 с.
4. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунная недостаточность (выявление и лечение). М.: Медицинская книга, 2003. 443 с.
5. Липоид – новые возможности в снижении сезонной заболеваемости у детей и взрослых: сборник рефератов научных статей. М: Тактик-Студио, 2009. 48 с.
6. Мавзютова Г.А., Фазлыева Р.М., Тюрина Е.Б. и др. Особенности иммунных нарушений при внебольничных пневмониях // Медицинская иммунология. 2007. Т. 9, № 6. С. 605–612.
7. Макарова О.П. Роль системы мононуклеарных фагоцитов в регуляции клеточных реакций при развитии острого воспалительного процесса в легких: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Новосибирск, 2002. 39 с.
8. Панфилов Д.В. Местный клеточный иммунитет у больных с инфекцией нижних дыхательных путей: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2000. 30 с.
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 // Пат. на изобр. № 23376620 С1; Бюл. 2008, № 31.
10. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология: норма и патология. М.: Медицина, 2010. 752 с.
11. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Диагностика заболеваний иммунной системы: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с.
12. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Чернеховская Н.Е. Пневмония. М.: Экономика и информатика, 2002. 408 с.
13. Pin I., Gibson P.G., Kolendowicz R. et al. Use of induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1992. Vol. 47. P. 25–29.
14. Popov T.A., Pizzichini M.M., Kolendowicz R. et al. Some technical factors influencing the induction of sputum for cell analysis // *Ibid.* 1995. Vol. 8. P. 559–565.

Поступила в редакцию 01.04.2011.

## OPTIMISING ESTIMATION OF PARAMETERS DESCRIBING FUNCTIONAL ACTIVITY OF INNATE IMMUNE CELLS IN CASE OF INFLAMMATORY LUNG DISEASES

N.M. Kondrashova<sup>1</sup>, N.G. Plekhova<sup>2</sup>, L.M. Somova<sup>2</sup>, A.V. Kostyushko<sup>1</sup>, B.I. Geltser<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Vladivostok State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russia), <sup>2</sup>Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)

**Summary** – The authors have applied their own method of estimating functional activity of innate immune cells in the areas of inflammation in an effort to optimise treatment of patients diagnosed with community-acquired pneumonia. As confirmed, in order to identify the state of tissue immune response, it is expedient to examine functional activity of cells from induced sputum cells known to most actively respond to the bacterial agents. It is desirable to study a number of parameters of functional activity of phagocytes and test their reserve capacities in order to improve objectiveness and reliability of the results. The proposed method allows to estimate effects from the treatment on the local defence of respiratory system, and therefore in a differentiated manner arrive at administering immunomodulating drugs.

**Key words:** community-acquired pneumonia, induced sputum, immunotherapy, reserve capacities of phagocytes.