

А.А.ШОРТАНБАЕВ, Б.Б.БИЖИГИТОВА, А.А.АБИЛЬБАЕВА

Казахский национальный медицинский университет имени С.Д.Асфендиярова
Кафедра общей иммунологии

РОЛЬ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ПРОДУКТА «АКТИМЕЛЬ» В УКРЕПЛЕНИИ ПРОТИВОИНФЕКЦИОННОЙ ЗАЩИТЫ

В статье рассмотрена роль пробиотического продукта в укреплении противоинфекционной защиты организма. В результате проведенных исследований установлено положительное влияние пробиотического продукта «Актимель» на показатели врожденной иммунной системы: неспецифическая стимуляция местного иммунитета кишечника; повышение метаболической активности фагоцитов; повышение продукции ИЛ-2 и ИФН-γ.

Ключевые слова: пробиотики, врожденный иммунитет, цитокины, фагоциты, противоинфекционный иммунитет.

Актуальность.

Индивидуальная восприимчивость организма к инфекциям определяется патогенностью микроорганизмов, факторами окружающей среды, а также иммуногенетическими особенностями иммунного реагирования. Защита на местном уровне после инфицирования возбудителем осуществляется прежде всего типичной воспалительной реакцией, которая направлена на распознавание и уничтожение патогена и его компонентов. Для осуществления этих процессов включаются механизмы как врожденного, так и адаптивного иммунитета. В- и Т-лимфоциты, осуществляющие адаптивный иммунный ответ, распознают патогены, используя высокоаффинные рецепторы. Однако развитие адаптивного иммунного ответа обычно происходит достаточно медленно, так как предполагает активацию, пролиферацию лимфоцитов и синтез ими цитокинов и иммуноглобулинов. Более быстрое развитие иммунных реакций обеспечивается врожденным иммунным ответом, клеточные компоненты которого распознают патогены при помощи специальных рецепторов с более широкой специфичностью, чем у рецепторов лимфоцитов.

Механизмы, с помощью которых врожденная иммунная система распознает патогены, являются достаточно эволюционно стабильными и обеспечивают эффективную защиту организма, несмотря на быструю мутационную изменчивость вирусов и бактерий. Основной причиной такой сохраняющейся эффективности является то, что врожденная иммунная система с помощью растворимых и клеточно-связанных рецепторов распознает широкие структурные мотивы, высоко консервативные в пределах определенных групп патогенов и обычно необходимые для их выживания, которые, как правило, отсутствуют у хозяина.

Многие фундаментальные исследования привели к выводу, что нормальная микрофлора человека играет огромную роль в его жизнедеятельности, развитии, формировании и поддержания здоровья [1]. Нормальная микрофлора слизистых является одним из ключевых регуляторов иммунной системы организма. Вместе с тем существует множество факторов, приводящих к нарушению баланса нормальной микрофлоры человека. При этом формирование дисбиотических нарушений на определенном участке слизистой неизбежно будет распространяться на другие отделы, нарушая функционирование системы иммунного гомеостаза В связи с чем наиболее изученным направлением поддержания и восстановления микрофлоры кишечника человека является использование микробных препаратов на основе как представителей нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека, так и микроорганизмов, выделенных из объектов окружающей среды [2].

Пробиотики - живые микроорганизмы, которые при введении в адекватном количестве, оказывают положительный эффект на здоровье человека. Пробиотики могут быть включены в состав различных типов пищевых продуктов, а также в лекарственные препараты и пищевые добавки. Наиболее часто используются пробиотики штаммов лактобактерий и бифидобактерий[3]. Они принимают участие в синтезе витаминов группы В, витамина К, фолиевой и никотиновой кислот и др., участвуют в ферментации белков и углеводов, а также в формировании иммунологической реактивности организма: активация

образования В и Т-лимфоцитов и макрофагов, синтез иммуноглобулинов, повышение активности лизоцима.

Многочисленными клиническими испытаниями было показано, что пробиотики стимулируют иммунную систему, нормализуют ее функционирование на разных уровнях: как местный иммунитет слизистых, так и системный: гуморальный и/или клеточный иммунитет[4].

Несмотря на то, что в последние годы появились работы, указывающие на возможность применения пробиотиков в укреплении противоинфекционной защиты, проблема целесообразности их применения для модуляции функции иммунной системы продолжает оставаться широко обсуждаемой[5].

Цель исследования

Изучить эффективность влияния кисломолочного пробиотического продукта Actimel на особенности функционирования врожденного иммунитета у лиц часто болеющих ОРВИ.

Материалы и методы исследования

В исследование было включено 100 человек, представленных лицами обоего пола (28 мужчин и 72 женщин) в возрасте от 17 лет до 25 лет. С помощью анкетирования выделена группа риска с клиническими признаками инфекционного синдрома. В группу риска по инфекционному синдрому были включены лица с хроническими рецидивирующими, часто повторяющимися, непрерывно текущими бактериальными, вирусными инфекциями.

Все исследуемые получали кисломолочный продукт Actimel по 100 мл 1 раз в день в течение 4-х недель ежедневно.

Методы исследования

Всем исследуемым проводилось определение метаболической активности фагоцитов и определение концентрации ИЛ-2, ИФН-γ и sIgA до и после окончания приема кисломолочного продукта Actimel.

Материалом для исследования служила слюна и венозная кровь, которая забиралась утром натощак путем венопункции в количестве 5,0 мл в пробирку-вакутейнер.

Тесты восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест), спонтанный и стимулированный, проводились по методике Нагоева Б.С. и Шубича М.Г (1981) [Нагоев Б.С., Шубич М.Г. Значение теста восстановления нитросинего тетразоля для изучения функциональной активности лейкоцитов //Лаб. дело, 1981, №4, С. 195-198]. При проведении спонтанного НСТ-теста лейкоциты, выделенные из периферической крови, смешивали с раствором нитросинего тетразоля, при проведении индуцированного НСТ-теста к полученной смеси добавляли раствор пирогенала. После инкубирования при 37⁰С в течение 30 минут готовили мазки, а затем в фиксированных и окрашенных по Романовскому-Гимзе мазках подсчитывали процент нейтрофилов, содержавших гранулы формазана.

Определение содержания спонтанной продукции цитокинов.

На сегодняшний день наиболее оптимальными для оценки уровней цитокинов являются иммуноферментные методы, которые высокоспецифичны, просты и быстры в исполнении. Применение диагностических иммуноферментных тест-систем для оценки цитокинового статуса как на местном, так и на системном уровнях при различных патологиях является существенным дополнением к пониманию патогенеза заболеваний и оценке функциональных возможностей

иммунитета при иммуноэпидемиологических обследованиях населения.

Определение содержания спонтанной продукции ИЛ-2, ИФН- γ и IgA проводилось с помощью тест-систем для иммуноферментного анализа производства ООО «Вектор-Бэст», г. Новосибирск.

Метод твердофазного иммуноферментного анализа основан на конструировании на твердой фазе (96-луночная плата для иммуноферментного анализа) комплекса, состоящего из: 1) мышинных моноклональных антител, специфически связывающих цитокин из раствора; 2) цитокина; 3) кроличьих поликлональных антител к цитокину; 4) конъюгата пероксидазы хрена с козьими антителами к иммуноглобулину кролика.

Комплекс формировался при последовательном внесении в плату соответствующих реагентов, избыток которых каждый раз удалялся аспирацией и промывкой платы. Количество связавшегося конъюгата, определяющего интенсивность развития окраски в каждой лунке после прибавления раствора хромогена, пропорционально количеству цитокина в исследуемом образце. Результат анализа вычислялся по

калибровочному графику после измерения оптической плотности в фотометре для ИФА со светофильтром на 492 нм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «Microsoft Excel 7.0 for Windows 2010» и «Statistica 7.0». При обработке данных исследования высчитывали следующие статистические параметры: средние значения (M), ошибку средней арифметической (m), среднее квадратическое отклонение (σ), критерий достоверности Стьюдента (t).

Результаты и их обсуждения.

Иммунологические показатели контрольной группы и группы исследуемых лиц до начала приема кисломолочного продукта Actimel.

Одним из главных критериев в диагностике нарушений иммунитета на популяционном уровне является уровень цитокинов - регуляторных пептидов, продуцируемых иммунокомпетентными клетками.

В настоящей работе из всего многообразия известных на сегодняшний день цитокинов для определения уровня спонтанной продукции были выбраны ИЛ-2 и ИФН- γ . Кроме того, определялся уровень IgA в слюне обследуемых лиц.

Таблица 1 - Средние значения концентраций цитокинов у обследованных лиц (M \pm m)

Цитокины (пг/мл)	Исследуемая группа n=82	Контрольная группа n=25
ИЛ-2	1,4 \pm 0,13	2,9 \pm 1,2*
ИФН- γ	0,81 \pm 0,05	2,1 \pm 0,3*
IgA	110,69 \pm 2,85	112 \pm 2,2

Примечание: * - достоверность различий между группами $p < 0,01$

В результате проведенных нами исследований были выявлены особенности спонтанной продукции цитокинов в исследуемой и контрольной группах.

Содержание ИЛ-2 в группе риска составило 1,4 \pm 0,13 пг/мл и было на 52% ниже соответствующего показателя условно здоровых людей контрольной группы ($p < 0,01$). Исследуемая и контрольная группы также отличались по содержанию ИФН- γ . Концентрация этого цитокина в в группе риска составила 0,81 \pm 0,05 пг/мл, а в контрольной была в 2,6 раза выше и составляла 2,1 \pm 0,3 пг/мл ($p < 0,01$). Показатели IgA в сравниваемых группах существенно не различались.

Оценка фагоцитарного звена иммунитета показала снижение метаболической активности фагоцитов периферической крови в

исследуемой группе. Так, результаты наших исследований показали, что в группе риска имеет место незначительное снижение в периферической крови количества нейтрофилов, содержащих гранулы формазана. В контрольной группе условно здоровых лиц содержание формазанположительных клеток в спонтанном тесте было в 1,2 раза выше $p < 0,01$, чем в группе риска (таблица 2) и составляло 1,8.

Стимуляция нейтрофилов пирогеналом в качестве активатора выявила в группе риска угнетение почти в 1,2 раза ответа оксидазных систем на дополнительную антигенную стимуляцию в индуцированном НСТ-тесте по сравнению с контролем.

Таблица 2 – Показатели метаболической активности фагоцитов в НСТ-тестах у обследованных лиц (M \pm m)

Показатели	Исследуемая группа n=90	Контрольная группа n=25
НСТ спонт.	22,1 \pm 0,9	26,32 \pm 1,2
НСТ индуц.	38,28 \pm 2,5	47,34 \pm 1,53
Индекс стимуляции	1,7	1,8

Выявленное нарушение резервных возможностей фагоцитов отражает наличие вторичного иммунодефицитного состояния фагоцитарной системы и может стать причиной роста заболеваемости имеющейся инфекционной патологии у обследованных лиц, входящих в группу риска.

Анализ иммунологических показателей показал, что в группе риска отмечается достоверное снижение по сравнению с контрольной группой таких показателей врожденного и адаптивного иммунитета, как продукция ИЛ-2 и ИФН- γ , а также некоторое снижение метаболической активности фагоцитов и индекса стимуляции в НСТ-тесте, что свидетельствует о

существовании или формировании вторичных иммунодефицитных состояний (ИДС) у этих людей. Как известно, наличие ИДС является фактором риска в отношении возможности возникновения инфекционных заболеваний.

Иммунологические показатели исследуемых лиц после окончания приема кисломолочного продукта Actimel

Оценка результатов показателей уровней цитокинов ИЛ-2 и ИФН- γ выявила увеличение концентрации данных цитокинов в сыворотке крови исследуемых, принадлежащих к группе риска, после приема кисломолочного продукта Actimel (таблица 3).

Таблица 3 - Показатели уровней цитокинов после окончания приема Actimel

Цитокины (пг/мл)	Контрольная группа n=25	Исследуемая группа (до начала приема Actimel) n=90	Исследуемая группа (после окончания приема Actimel) n=70
ИЛ-2	2,9 \pm 1,2	1,4 \pm 0,13	2,71 \pm 0,22*
ИФН- γ	2,1 \pm 0,3	0,81 \pm 0,05	1,54 \pm 0,05*

Примечание: * - достоверность различий между группами $p < 0,01$

Так после окончания приема Actimel произошло увеличение концентрации ИЛ-2 почти в 2 раза. Так, его содержание до начала приема Actimel составляло $1,4 \pm 0,13$ пг/мл, то после окончания приема составило $2,71 \pm 0,22$ ($p < 0,01$).

При этом концентрация ИФН- γ в группе риска до начала приема молочного продукта была снижена в 2,5 раза по сравнению с

показателем контрольной группы, то после окончания приема Actimel составила $1,54 \pm 0,05$ пг/мл и приблизилась к значению контроля ($p < 0,01$).

Концентрация IgA после окончания приема Actimel существенно не изменялась.

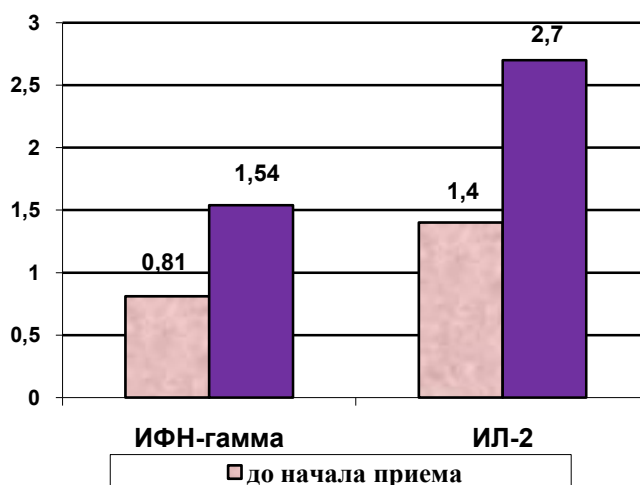


Рисунок 1 - Уровень содержания ИЛ-2 и ИФН- γ до и после окончания приема Актимель

При анализе результатов функциональных тестов фагоцитарного звена иммунитета установлено, что Actimel положительно влияет на показатели фагоцитарного звена иммунитета.

Таблица 4 – Влияние Actimel на показатели фагоцитарного звена иммунитета

Показатели	Контрольная группа n=25	Исследуемая группа (до начала приема Actimel) n=90	Исследуемая группа (после окончания приема Actimel) n=70
НСТ спонт.	$26,32 \pm 1,2$	$22,1 \pm 0,9$	$26,12 \pm 1,14$
НСТ индуц.	$47,34 \pm 1,53$	$38,28 \pm 2,5$	$48,58 \pm 1,5$
Индекс стимуляции	$1,8 \pm 0,05$	$1,73 \pm 0,04$	$1,8 \pm 0,04$

Как видно из результатов, представленных в таблице 4, способность нейтрофилов крови у исследуемых лиц восстанавливать нитросиний тетразолий до начала приема Actimel составляла $22,1 \pm 0,9\%$ против $26,32 \pm 1,2\%$ контрольной группы (таблица 4), т.е. кислородзависимая активность фагоцитов была снижена на 17%. К концу 4-х недельного приема молочного продукта кислородзависимая бактерицидная активность в спонтанном и индуцированном НСТ-тестах составили $26,12 \pm 1,14\%$ и $48,58 \pm 1,5\%$ соответственно. Восстановление функциональной активности нейтрофилов отражает активацию фагоцитарного звена врожденного иммунитета и создает возможности для усиления элиминации возбудителя.

Важно отметить, что в исследуемой группе больных до начала приема кисломолочного продукта Actimel индекс стимуляции практически не отличался от контрольных значений. Видимо, несмотря на дисфункцию, нейтрофилы сохраняли резервный потенциал, который остается невостребованным в результате большего влияния ингибирующих механизмов, чем активирующих. Так, индекс стимуляции нейтрофилов до начала приема Actimel составлял $1,73 \pm 0,04$ и был ниже показателя

здоровых лиц. После окончания приема Actimel индекс стимуляции сравнялся с уровнем здоровых.

Выводы.

В заключении мы можем сказать, что полученные данные нашего исследования согласуются с исследованиями других авторов, также отмечающих преимущественное влияние продукта на фагоцитарное звено иммунитета.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что 4-х недельный прием молочного продукта Actimel оказал положительное действие на показатели врожденной иммунной системы: неспецифическая стимуляция местного иммунитета кишечника; повышение метаболической активности фагоцитов (основные клетки врожденного иммунитета); повышение продукции ИЛ-2 и ИФН- γ . При применении Actimel у исследуемых лиц побочных эффектов не отмечалось. Таким образом установлено, что ежедневное употребление пробиотического кисло-молочного продукта Actimel положительно влияет на показатели иммунной системы организма, что укрепляет противомикробную защиту часто болеющих лиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Социально-экологические и клинические последствия дисбаланса микробной экологии человека и животных. — М.: Грантъ, 1998. — Т. 2. — 420 с.
- 2 Шевелева С.А. Медико-биологические требования к пробиотическим продуктам и биологически активным добавкам к пище // Инфекционные болезни. — 2004. — № 3. — С. 86–90.
- 3 Всемирная Гастроэнтерологическая Организация Пробиотики и пребиотики//практическое руководство - 2008. – С. 3-5.
- 4 А.И. Гришель, Е.П. Кишкурно Пробиотики и их роль в современной медицине// Вестник фармации 2009. - №1 – С. 90-93.
- 5 Калюжин О.В. Пробиотики как современные средства укрепления противoinфекционной иммунной защиты: миф или реальность?// РМЖ. 2012. №12. – С.32-46

А.А.ШОРТАНБАЕВ, Б.Б.БИЖИГИТОВА, А.А.АБИЛЬБАЕВА

«АКТИМЕЛЬ» ПРОБИОТИКАЛЫҚ ӨНІМІНІҢ ЖҰҚПАҒА ҚАРСЫ ҚОРҒАНЫШТЫ ЖОҒАРЛАТУДАҒЫ МАҢЫЗЫ

Түйін: Мақалада пробиотикалық өнімінің организмді жұқпадан қорғау механизмін жоғарлатудағы маңызы қарастырылған. Иммунологиялық зерттеулер нәтижесінде «Актимель» пробиотикалық өнімінің туа біткен иммунитет көрсеткіштеріне оң әсер ететіні анықталды: ішектегі жергілікті иммунитеттің арнайы емес ынталануы; фагоциттердің метаболикалық белсенділігі және ИЛ-2 мен ИФН-γ өнімі жоғарлады.

Түйінді сөздер: пробиотиктер, туа біткен иммунитет, цитокиндер, фагоциттер, жұқпаға қарсы иммунитет.

A.A. SHORTANBAYEV, B.B. BIZHIGITOVA, A.A. ABILBAYEVA

ROLE OF PROBIOTIC PRODUCT IN STRENGTHENING ANTI-INFECTIOUS DEFENSE THE ORGANISM

Resume: Role of probiotic product in strengthening anti-infectious defense the organism is investigated. The probiotic product “Actimel” has had a positive effect on the innate immune system. It was shown in non-specific stimulation of local immunity of the intestine; increasing in metabolic activity of phagocytes; increasing production of IL-2 and IFN-γ.

Keywords: probiotics, innate immunity, cytokines, phagocytes, anti-infection immunity