

УДК 616.988-053.2-08:612.017.1

*Л.В. Квашніна, В.П. Чернишов, І.М. Матвієнко, Т.Б. Ігнатова, Д.В. Осипчук*

## **Вплив лікарського засобу «Резістол®» на гуморальний та клітинний імунітет дітей з рекурентними та гострими вірусними респіраторними захворюваннями: результати дослідження**

ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України», м. Київ

SOVREMENNAYA PEDIATRIYA.2018.8(96):104-112; doi 10.15574/SP.2018.96.104

НК-лімфоцити (natural killers) є основними ефекторами природженого імунітету у подоланні вірусних інфекцій: вони беруть участь в імунному захисті, безпосередньо елімінують вірусинфіковані та злоякісно трансформовані клітини, активують інші клітини імунної системи завдяки секреції цитокінів. Стимуляція TLRs, зокрема TLR3, що експресуються майже на всіх НК-лімфоцитах, активує їх, що і призводить до секреції цитокінів, ІФН-γ та підвищення клітинного лізису вірусинфікованих і пухлинних клітин. Тобто розпізнавання вірусів через TLR3 допомагає НК-клітинам відігравати фундаментальну роль у першій лінії захисту організму проти вірусних інфекцій.

Результати науково-дослідної роботи з вивчення впливу лікарського засобу «Резістол®» на активність імунного захисту у дітей з ГРВІ та рекурентними інфекціями верхніх дихальних шляхів продемонстрували, що на тлі використання «Резістол®» достовірно зростала кількість НК-клітин, які можуть безпосередньо розпізнавати вірусні патогени ( $p < 0,05$ ). Водночас у групі дітей з ГРВІ, яким не застосовувався ЛЗ «Резістол®», не відбувалося достовірних змін відсоткового вмісту в периферичній крові активованих НК-клітин. У групі дітей з ГРВІ, у яких застосовувався ЛЗ «Резістол®», спостерігались достовірно вищі абсолютні показники лейкоцитів та лімфоцитів порівняно з групою дітей, у яких «Резістол®» не застосовувався ( $p < 0,05$ ), тоді як на початку лікування та спостереження дані показники не мали статистичних відмінностей між групами ( $p > 0,05$ ).

**Ключові слова:** діти, гуморальний імунітет, клітинний імунітет, гостра респіраторна вірусна інфекція, рекурентні інфекції, Pelargonium Sidoides, ЛЗ «Резістол®».

### **Influence of Resistol® Drug on Humoral and Cellular Immunity of Children with Recurrent and Acute Viral Respiratory Diseases: Research Findings**

*L.V. Kvashnina, V.P. Chernyshov, I.M. Matvienko, T.B. Ignatova, D.V. Osypchuk*

State Institution «Institute of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology named after Academician O.M. Lukyanova, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv

NK-lymphocytes (natural killers) are the main innate immunity effectors in overcoming viral infections: they participate in the immune defense, directly eliminate virus-infected and malignantly transformed cells, activate other cells of the immune system through the secretion of cytokines. Stimulation of TLRs, and TLR3 in particular, which are expressed in almost all NK-lymphocytes, activates them, leading to secretion of cytokines, IFN- $\gamma$ , and increased cellular lysis of virus-infected and tumor cells. That is, recognition of viruses through TLR3 helps NK cells play a crucial role in the first line of organism protection against viral infections.

The results of the research on the influence of the medicinal product «Resistol®» on the immune defense activity in children with ARVI and recurrent upper respiratory tract infections demonstrated that on the background of «Resistol®» use the number of NK cells that could directly recognize viral pathogens increased ( $p < 0.05$ ). At the same time, in the group of children with acute respiratory viral infections, who did not use Resistol®, there was no significant change in the percentage of activated NK cells in peripheral blood. In the group of children with acute respiratory infections who used Resistol®, significantly higher absolute values of leukocytes and lymphocytes were registered as compared with the group of children in whom Resistol® was not used ( $p < 0.05$ ), whereas at the beginning of treatment and observation these data did not differ statistically between the groups ( $p > 0.05$ ).

**Key words:** children, humoral immunity, cellular immunity, acute respiratory viral infection, recurrent infections, Pelargonium Sidoides, Resistol®.

### **Влияние лекарственного средства «Резистол» на гуморальный и клеточный иммунитет детей с рекуррентными и острыми вирусными респираторными заболеваниями: результаты исследования**

*Л.В. Квашнина, В.П. Чернышев, И.Н. Матвиенко, Т.Б. Игнатова, Д.В. Осипчук*

ГУ «Институт педиатрии, акушерства и гинекологии имени академика Е.М. Лукьяновой НАМН Украины», г. Киев

НК-лимфоциты (natural killers) являются основными эффекторами врожденного иммунитета в борьбе с вирусными инфекциями: они принимают участие в иммунной защите, непосредственно элиминируют вирусинфицированные и злокачественно трансформированные клетки, активируют другие клетки иммунной системы благодаря синтезу цитокинов. Стимуляция TLRs, в частности TLR3, которые экспрессируются практически на всех НК-лимфоцитах, активирует их, что и приводит к секреции цитокинов, ИФН- $\gamma$  и повышению лизиса вирусинфицированных и опухолевых клеток. То есть распознавание вирусов через TLR3 помогает НК-клеткам играть фундаментальную роль в первой линии защиты организма против вирусных инфекций.

Результаты научно-исследовательской работы по изучению влияния препарата «Резистол» на активность иммунной защиты у детей с ОРВИ и рекуррентными инфекциями верхних дыхательных путей продемонстрировали, что на фоне приема ЛС «Резистол» достоверно увеличивалось количество НК-клеток, которые могут непосредственно распознавать вирусы ( $p < 0,05$ ). В то же время в группе детей с ОРВИ, которым не применяли «Резистол», не происходило достоверных изменений процентного содержания в периферической крови активированных НК-клеток. В группе детей с ОРВИ, которых лечили препаратом «Резистол», наблюдались достоверно более высокие абсолютные показатели лейкоцитов и лимфоцитов по сравнению с группой детей, у которых «Резистол» не применялся ( $p < 0,05$ ), в то время как в начале исследования данные показатели не имели статистических различий между группами ( $p > 0,05$ ).

**Ключевые слова:** дети, гуморальный иммунитет, клеточный иммунитет, острая респираторная вирусная инфекция, рекуррентные инфекции. Pelargonium Sidoides, Резистол.

### Вступ

Незважаючи на достатню кількість впроваджених клінічних протоколів та настанов, ситуація щодо інфекційної захворюваності дітей у світі протягом останніх років не покращується: інфекції дихальних шляхів посідають третє місце у структурі смертності в усіх вікових та гендерних групах, поступаючись тільки серцево-судинним та цереброваскулярним захворюванням, а в світі щорічно витрачається біля 35 млн доларів на вирішення проблем, пов'язаних з інфекціями дихальних шляхів (госпіталізація, смертність, інвалідизація) [3]. В Україні щорічно на гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ) хворіє біля 6 млн населення, і найбільшу кількість захворілих становлять діти. За даними літератури, постійні виділення з носових ходів, довготривалий кашель, відсутність ефекту від стандартної терапії зустрічаються у 25–40% дітей дошкільного та молодшого шкільного віку переважно в осінньо-весняний період року [3] на тлі зростання резистентності вірусів до певних груп лікарських засобів (противірусні препарати). Саме тому тривають пошуки методів та ліків, які не тільки зменшать важкість перебігу респіраторних інфекцій, але й дадуть змогу організму дитини підвищити опірність до збудників захворювання.

Одним з альтернативних медикаментів може бути рослинний препарат, виготовлений з кореня *Pelargonium Sidoides*. Цей лікарський засіб (ЛЗ) рослинного походження широко використовується в Німеччині, Великобританії, Туреччині, Бразилії, країнах Балтики для лікування гострих інфекцій дихальних шляхів [17] та з метою профілактики в групі дітей з рекурентними респіраторними інфекціями. Екстракт містить первинні поліфеноли (катехін та галлокатехін, продельфінідин), протеїни, мінерали, а також, у менших концентраціях, похідні 7-кумарину (включаючи умкалін) [17],

які відрізняються за структурою від добре відомого антикоагулянта кумарину, та ніяк не пов'язані з антикоагулянтною активністю або взаємодією з варфарином [14]. За рахунок своїх біологічно активних компонентів екстракт *Pelargonium Sidoides* має мультифакторну дію, що включає противірусну та помірну антибактеріальну дію [7,8,13,15,16]. Дослідження *in vitro* продемонстрували здатність екстракту активувати протипухлинний фактор ( $\alpha$ -TNF), стимулювати продукцію  $\beta$ -інтерферону та підвищувати активність натуральних клітин-кілерів (NK); під дією екстракту покращувався фагоцитоз та пригнічувалась адгезія збудника до клітин епітелію.

Екстракт *Pelargonium Sidoides* також продемонстрував клінічну ефективність у зменшенні важкості та тривалості перебігу інфекцій верхніх дихальних шляхів (ВДШ) — бронхіт, риносинусит, тонзилофарингіт. Метааналіз 2008 року (Cochrane Review), який містить результати лікування 3800 пацієнтів у сліпому плацебо-контрольованому РКД та 5400 пацієнтів у неінтервенційному відкритому дослідженні (пацієнти віком від 1 року життя), продемонстрував ефективність та безпеку екстракту.

Дослідження, проведені співробітниками ДУ «ІПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України» [1], продемонстрували високу клінічну ефективність екстракту *Pelargonium Sidoides* (ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>», краплі оральні, виробництва ПАТ «Галичфарм», Україна) у веденні дітей з гострими бронхітами та риносинуситами, а також високу активність щодо підвищення рівнів sIgA, який відіграє найбільшу роль у захисті респіраторного тракту та легень від проникнення збудників у тканини шляхом аглютинації мікроорганізмів та нейтралізації токсинів, інгібує зв'язування вірусів та бактерій з поверхнею слизових оболонок та блокує реплікацію збудника [4,21,22] (табл.1).

Таблиця 1

Концентрація імунних факторів у слині дітей с гострим респіраторним захворюванням до і після прийому ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>» [1]

Імунні фактори (г/л)	Група дітей (n=15)	До прийому ЛЗ	Після прийому ЛЗ	Контрольні показники
sIgA		0,16±0,01**	0,40±0,02*	0,41±0,06
IgG		0,050±0,002	0,080±0,002*	0,070±0,016
IgA		0,05±0,01	0,07±0,02	0,05±0,01
Лізоцим		0,013±0,006	0,010±0,001	0,010±0,002

Примітка: \* — різниця достовірна між показниками до та після прийому препарату (p<0,05); \*\* — різниця достовірна між показниками порівняно з контролем (p<0,05).

Загалом дослідження, проведене в ДУ «ІПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України» [1], продемонструвало, що ЛЗ «Резістол®» сприяє не тільки регресії клінічної симптоматики, але й ерадикації патогенів, має виразні імуномодулюючі властивості та підвищує неспецифічну резистентність організму. Також дослідження довело безпечність використання ЛЗ «Резістол®» у дітей – протягом курсу лікування не було зареєстровано жодного ускладнення. Ці результати повністю збігаються з результатами аналізу безпеки використання екстракту *Pelargonium Sidoides* в країнах Європи: за період 1994–2006 рр. було реалізовано 304 млн щоденних доз EPs 7630, а частота ускладнень/побічних ефектів склала 0,53 випадку на 1 000 000 щоденних доз [18]. Це означає, що тільки 1 із 189 000 пацієнтів мав побічну реакцію/ускладнення: 0,27/1000000 доз реакції гіперчутливості, 0,13/1000000 розлади шлунково-кишкового тракту, 0,05/1000000 кровотеча з ясен або носові кровотечі.

Отримані результати підтвердили, що ЛЗ «Резістол®» можна використовувати як з лікувальною, так і з профілактичною метою для стимуляції неспецифічної резистентності організму у дітей з рекурентними респіраторними інфекціями. З огляду на вищенаведене та отримані результати щодо наявності імуномодулюючого впливу ЛЗ «Резістол®» [1,4, 7,13,

16, 21,22], виникла необхідність поглибленого вивчення його противірусного ефекту через Toll-подібні рецептори 3 (англ. Toll-like receptors).

#### Ідея дослідження

Toll-подібні рецептори (TLRs) – це клас клітинних рецепторів з одним трансмембранним доменом, які відіграють одну з ключових ролей у природженому імунитеті: саме вони розпізнають структури мікроорганізмів і активують проти них імунну відповідь. Загалом відомо 13 TLRs ссавців, що позначаються аббревіатурами (TLR1 – TLR13), у людини існує 10 TLRs (TLR1 – TLR10) – саме вони зв'язують різні ліганди і представлені в організмі людини на різних типах клітин (моноцити, макрофаги, нейтрофіли, опасисті клітини, еозинофіли та ін.).

TLRs забезпечують ідентифікацію патогена із подальшим включенням важливих компонентів спадкового імунітету, та відіграють вирішальну роль у ранньому захисті організму від чужорідних структур. Функціонуючи на зовнішній мембрані клітин, TLRs мають характерну властивість розпізнавати молекулярні структури мікроорганізмів (певні бактеріальні, вірусні чи грибові), які отримали назву PAMP (pathogen-associated molecular patterns – «структури, які пов'язані з патогеном») [10].

З точки зору імунного захисту організму дитини, певний інтерес викликають TLR3 (рис. 1),

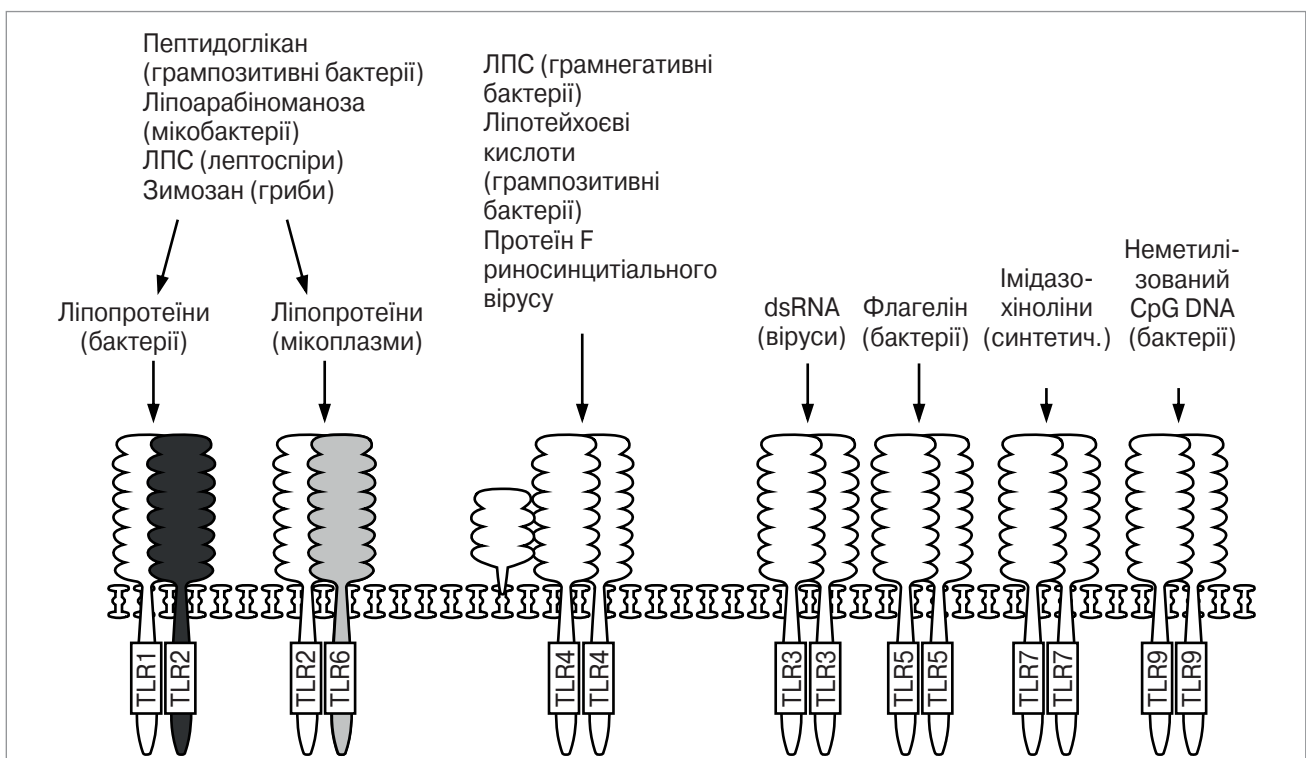


Рис.1. Лігандна специфікація Toll-подібних рецепторів (TLR) за S. Janssens та R.Beyaert, 2003

Таблиця 1

Розподіл дітей на групи дослідження

1 група: діти з ГРВІ		2 група: діти з рекурентними захворюваннями ВДШ		3 група: здорові діти
Група 1а: без використання ЛЗ «Резістол®»	Група 1б: з використанням ЛЗ «Резістол®»	Група 2а: без використання ЛЗ «Резістол®»	Група 2б: з використанням ЛЗ «Резістол®»	Контрольна група
10 дітей	10 дітей	10 дітей	10 дітей	10 дітей

які «відповідають» саме за протівірусний захист, мають внутрішньоклітинне розташування та діють через дендритні клітини та  $\beta$ -лімфоцити. TLR3 розпізнає та зв'язується з дволанцюговою РНК (длРНК), що є обов'язковим проміжним продуктом реплікації РНК-вмісних вірусів. Стимуляція TLRs активує НК-лімфоцити, що призводить до секреції цитокінів, підвищення клітинного лізису вірусінфікованих і пухлинних клітин [6,11,19].

Відомо, що НК-лімфоцити є основними ефекторами природженого імунітету у подоланні вірусних інфекцій. Вони беруть участь в імунному захисті, безпосередньо елімінують вірусінфіковані та злоякісно трансформовані клітини та активують інші клітини імунної системи завдяки секреції цитокінів [20]. На НК-лімфоцитах людини експресуються майже всі TLR, зокрема TLR3. Доведено, що стимуляція НК-лімфоцитів синтетичним аналогом длРНК – poly I:C, який є лігандом TLR3, індукує секрецію ІФН- $\gamma$  та низки інших прозапальних цитокінів, котрі є важливими регуляторами імунної відповіді. Також, у відповідь на стимуляцію TLR3, НК-клітини підвищують експресію маркера активації CD69 [5,12,23]. Тобто розпізнавання вірусів через TLR3 допомагає НК-клітинам відігравати фундаментальну роль у першій лінії захисту організму проти вірусних інфекцій. Саме наявність цього ефекту при використанні ЛЗ «Резістол®» було цікаво дослідити у дітей як з гострими, так і рекурентними респіраторними захворюваннями.

#### Мета і завдання науково-дослідної роботи

Головною метою даної дослідної роботи було вивчення впливу ЛЗ «Резістол®» на імунітет дітей з гострими та рекурентними респіраторними захворюваннями (стадія клінічного благополуччя) вікової групи >1 рік – 7 років життя. Під час проведення роботи було заплановано:

- дослідити активаційну відповідь НК-клітин при стимуляції протівірусного рецептора TLR3 за допомогою синтетичного аналога длРНК – poly I:C;
- дослідити процентне співвідношення НК-клітин та Т-лімфоцитів;

- вивчити рівні прозапальних та протизапальних цитокінів (інтерлейкін 6 та інтерлейкін 8 – ІЛ-6 та ІЛ-8).

#### Дизайн та повнота дослідження

У дослідженні взяли участь 50 дітей вікової групи >1 року – 7 років життя, які знаходились під наглядом у відділенні медичних проблем здорової дитини та преморбідних станів ДУ «ІПАГ імені академіка О.М. Лук'янової НАМН України» та були розподілені на три групи (табл. 1). Усі діти повністю завершили дослідження, тобто не було жодної дитини, яка б вибула з дослідження з будь-яких причин. Відповідно до етичних вимог, у 100% випадків обома батьками було підписано форми інформованої згоди на участь дитини у дослідженні.

У групах дітей, які отримували ЛЗ «Резістол®» (20 дітей) протягом 21 дня послідовно (як з лікувальною, так і з профілактичною метою), було дотримано наступний режим дозування: 1–6 років: по 10 крапель 3 рази на добу; >6–7 років: по 20 крапель 3 рази на добу. Під час дослідження жодна дитина не приймала ЛЗ, крім симптоматичних (деконгестанти, сольові розчини для промивання носової порожнини, тепле пиття), що повністю відповідає основним рекомендаціям чинних клінічних протоколів, затверджених МОЗ України.

Усі діти 1 та 2 груп отримали повний спектр клінічних обстежень – три послідовні клінічні огляди: на початку дослідження, на 14-у добу дослідження, наприкінці дослідження (21 день).

Жодна досліджувана дитина не потребувала позапланового клінічного огляду у зв'язку з погіршенням стану або розвитком побічних/небажаних реакцій.

Усім дітям з гострими та рекурентними захворюваннями (40 дітей) двічі проводився забір венозної крові в об'ємі від 500 мкл до 2 мл (підготовленим медичним персоналом з дотриманням умов асептики) на початку та наприкінці (через 21 добу) виконання роботи для вивчення активаційної відповіді НК-клітин при стимуляції протівірусного рецептора TLR3 за допомогою синтетичного аналога



длРНК — poly I:C (Sigma-Aldrich, США) з дотриманням усіх вимог до зберігання та використання реактивів та обладнання (інкубатор Revco, Швейцарія; проточний цитометр FACScan Becton Dickinson, США).

Обробка отриманих результатів відбувалась за допомогою програмного забезпечення Cell Quest software (BD Biosciences, США). Під час проведення імунологічного дослідження зразків венозної крові визначались:

- абсолютні та відносні показники клітин крові (лейкоцити, лімфоцити, моноцити);
- рівні цитокінів (Interleukin-6 (IL-6); Interleukin-8 (IL-8));
- рівні активованих **CD69<sup>+</sup>** НК-клітин;
- **CD69<sup>+</sup>** є маркером ранньої активації НК-клітин та універсальним маркером для використання *in vitro* у лабораторно-функціональних тестах: він має низьку щільність експресії на мембрані неактивованих клітин, швидко експресується на стимульованих лімфоцитах, що забезпечує безпосереднє вимірювання відповіді на стимул в експерименті, зменшуючи вплив будь-яких факторів. Експресія **CD69** у відповідь на стимуляцію потребує транскрипції нових молекул РНК та синтезу протеїнів, є невід'ємною частиною активаційного процесу та відображає функціональноактивну субпопуляцію НК-клітин [5,9];

- відсотковий вміст **CD19<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>**:

В-лімфоцити, які безпосередньо відповідають за продукцію антитіл;

- відсотковий вміст **CD8<sup>+</sup>**:

цитотоксичні Т-лімфоцити, які знищують інфіковані та злякано трансформовані клітини;

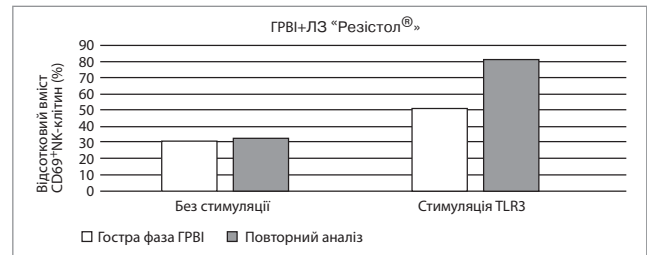
- відсотковий вміст **CD4<sup>+</sup>**:

Т-лімфоцити, які переважно виконують імунорегулюючу функцію, регулюють продукцію антитіл та беруть участь у механізмах гіперчутливості [21].

### Результати імунологічних досліджень у дітей з ГРВІ (1 група дітей)

У групі дітей з ГРВІ, які приймали ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>» (група Іб), достовірно зростала ( $p < 0,05$ ) кількість НК-клітин, які можуть безпосередньо розпізнавати вірусні патогени (рис. 2). Натомість у групі дітей з ГРВІ, яким не застосовувався ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>» (група Іа), не відбувалось достовірних змін відсоткового вмісту в периферичній крові активованих НК-клітин.

У групі дітей з ГРВІ, які застосовували ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>», при повторному обстеженні спостері-



\* $p < 0,05$  — порівняно з гострою фазою (початок захворювання).

**Рис. 2.** Зміна відсоткового вмісту активованих **CD69<sup>+</sup>** НК-клітин у групі дітей з ГРВІ при застосуванні ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>»: «без стимуляції» — це показник, який відбиває відсотковий вміст у периферичній крові активованих НК-клітин (тобто тих, що експресують маркер активації **CD69**); «стимуляція» — показник результату функціонального тесту, в основі якого лежить інкубація периферичної крові з агоністом TLR-3 — poly I:C та подальша оцінка відсоткового вмісту активованих НК-клітин (**CD69<sup>+</sup>**). Саме цей показник дає змогу оцінити функціональний протівірусний потенціал НК-клітин, тобто здатність цих клітин активуватися при взаємодії через протівірусний рецептор TLR3

гались достовірно вищі ( $p < 0,05$ ) абсолютні показники лейкоцитів та лімфоцитів порівняно з групою дітей, що не приймали ЛЗ (група Іа), тоді як на початку лікування та спостереження дані показники не мали статистичних відмінностей між групами ( $p > 0,05$ ) (рис. 3, 4).

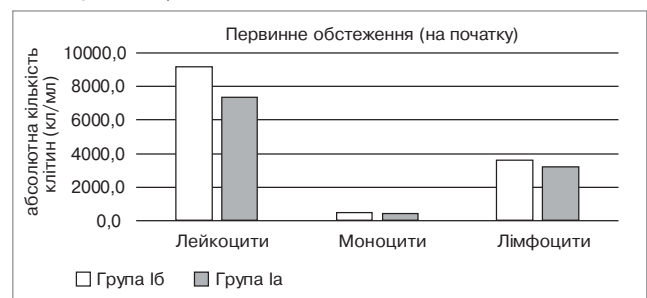
Аналіз результатів дослідження концентрації сироваткових цитокінів IL-6 та IL-8 у групах дітей з ГРВІ (1а та 1б) не виявив достовірних відмінностей обраних показників у динаміці, як у групі Іб (рис. 5), так і в групі Іа (рис. 6).

Таким чином, можна стверджувати, що основні зміни в групах дітей з ГРВІ відбува-

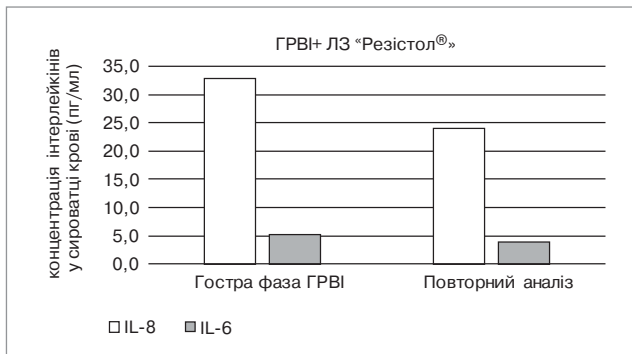


\* $p < 0,05$  — у порівнянні між групами 1а та 1б

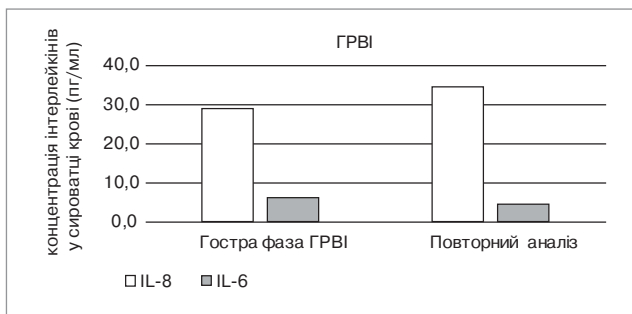
**Рис. 3.** Абсолютні значення імунних показників крові при повторному обстеженні (після 21-денного курсу лікування або спостереження)



**Рис. 4.** Абсолютні значення імунних показників крові на початку дослідження ( $p > 0,05$  у порівнянні між групами)



**Рис. 5.** Концентрації сироваткових цитокінів IL-8 та IL-6 у групі дітей з ГРВІ, які отримували ЛЗ «Резістол» (група Іб)



**Рис. 6.** Концентрації сироваткових цитокінів IL-8 та IL-6 у групі дітей з ГРВІ, які не отримували ЛЗ «Резістол» (група Іа)

лись у показниках клітинного імунітету. У дітей, яким проводилось лікування ГРВІ з використанням ЛЗ «Резістол» краплі оральні (ПАТ «Галичфарм», Україна), достовірно збільшувалась абсолютна кількість лейкоцитів за рахунок лімфоцитів – клітин, які переважно залучені до елімінації вірусних патогенів. Також у групі дітей з ГРВІ, які отримували ЛЗ «Резістол», достовірно зростала кількість НК-клітин, що здатні активуватись при стимуляції TLR3 (тобто здатні безпосередньо розпізнати вірусні патогени), що можна віднести до дії активних речовин ЛЗ «Резістол».

### **Застосування ЛЗ «Резістол» для профілактики рекурентних інфекцій**

Респіраторні інфекції у світі займають перше місце серед усіх захворювань, 85% цих інфекцій припадає на дитячий вік. До групи дітей з рекурентними інфекціями ВДШ зазвичай відносять дітей, які хворіють на повторні респіраторні інфекції протягом одного року (6–12 епізодів на рік, за даними різних авторів та настанов). Цікаво, що спроба знайти причину частих захворювань тільки в полі порушень з боку імунної системи виявилась не зовсім вдалою. У дітей із рекурентними інфекціями ВДШ дійсно частіше відзначалися знижені показники імунітету, проте різниця була несуттєвою – майже у половині дітей з рекурентними інфекціями імунологічні

показники крові були в межах вікової норми або, навіть, підвищеними [2].

Як уже зазначалося, НК-лімфоцити є основними ефекторами природженого імунітету у подоланні вірусних інфекцій. Функціональний тест з оцінкою експресії *CD69* на НК-клітинах відображає функціонально активну субпопуляцію цих клітин та є актуальним для аналізу не лише при ГРВІ, але й в групах дітей з рекурентними інфекціями ВДШ для виявлення можливих порушень, що можуть лежати в основі підвищеної чутливості до збудників респіраторних інфекцій.

Враховуючи літературні дані щодо відсутності суттєвих відмінностей в імунологічних показниках між здоровими дітьми та дітьми з рекурентними інфекціями ВДШ, у якості додаткового контролю також досліджували функціональний стан ланки НК-клітин у групі здорових дітей для подальшого аналізу та порівняння цього параметра з групами дітей з рекурентними інфекціями ВДШ.

Порівняльний аналіз імунологічних досліджень показав, що в групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким застосовували ЛЗ «Резістол» (група 2б), відсотковий вміст НК-клітин був достовірно вищим ( $p < 0,05$ ) при первинному аналізі порівняно з контрольною групою (група 3) (рис. 7).

Водночас відсоток НК-клітин з активаційним фенотипом був достовірно зниженим ( $p < 0,05$ ) при порівнянні з контрольною групою (рис. 8), як при первинному, так і при повторному аналізі. Такі дані можуть бути проявом компенсаторного механізму зниженої функціональності НК-клітин за рахунок зростання їх кількісного показника, який частково коригується після застосування ЛЗ «Резістол» (рис. 7, 8) – простежується тенденція до зниження кількісного показника НК-клітин при одночасному зростанні відсотка клітин з активаційним фенотипом без стимуляції та достовірного зростання відсоткового вмісту НК-клітин, що здатні активуватись при стимуляції TLR3, порівняно з контролем (група 3) (рис. 8).

Для детальнішого розуміння імунологічних процесів, які відбувались у групах, було проведено аналіз імунологічних показників у динаміці. Дослідження показали, що в групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, у якій з метою профілактики застосовували ЛЗ «Резістол» (група 2б), основні імунні показники залишалися без достовірних змін (рис. 9).



\* $p < 0,05$  — порівняно з контрольною групою

**Рис. 7.** Показники відсоткового вмісту NK-клітин (у динаміці) у дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким застосовували ЛЗ «Резістол®» (група 2б) порівняно з контрольною групою (група 3)



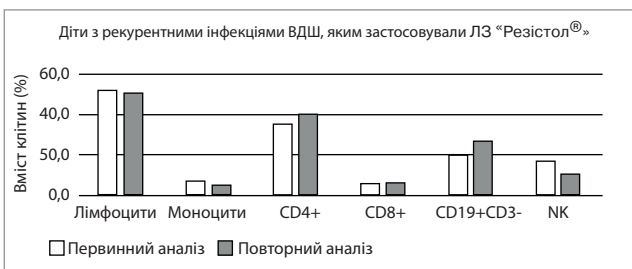
\* $p < 0,05$  — порівняно з аналогічним показником у контрольній групі

**Рис. 8.** Зміни відсоткового вмісту активованих CD69+ NK-клітин у групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким застосовували ЛЗ «Резістол®» (група 2б), порівняно з контрольною групою (група 3)

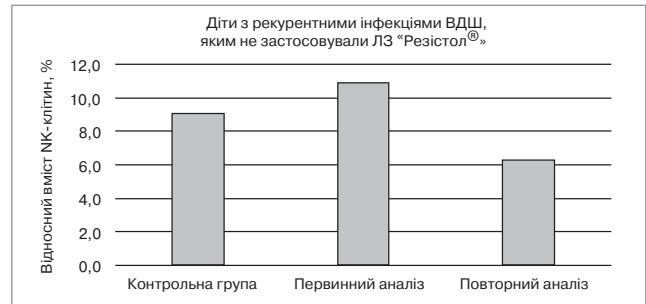
Проте у цій групі зростав відсотковий вміст активованих NK-клітин (CD69+) після застосування ЛЗ «Резістол®» (рис. 8).

У групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким не призначали профілактично Резістол®, дослідження виявило динаміку зниження відсотка NK-клітин порівняно з контрольною групою здорових дітей (група 3) (рис. 10) (різниця недостовірна,  $p > 0,05$ ).

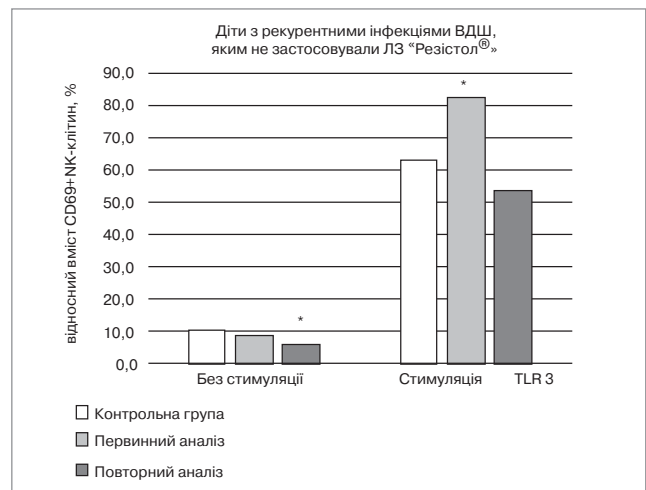
Проте, на відміну від групи дітей, яким призначали з профілактичною метою Резістол®



**Рис. 9.** Зміни імунологічних показників у групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким застосовували ЛЗ «Резістол®» (група 2б) з профілактичною метою



**Рис. 10.** Показники відсоткового вмісту NK-клітин (у динаміці) у дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким не застосовували ЛЗ «Резістол®» (група 2а), порівняно з контрольною групою (група 3)



\* $p < 0,05$  — порівняно з аналогічним показником у контрольній групі

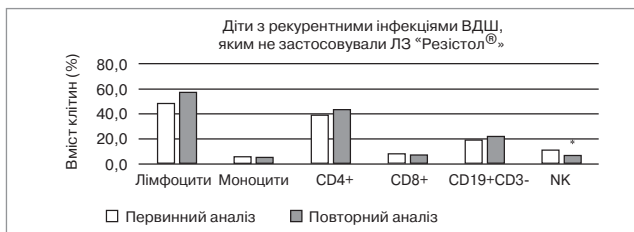
**Рис. 11.** Зміни відсоткового вмісту активованих CD69+ NK-клітин рекурентними інфекціями ВДШ у групі дітей, яким не застосовували ЛЗ «Резістол®» (група 2а), у порівнянні з контрольною групою (група 3)

(група 2б), у даній групі (група 2а) спостерігалось достовірне зниження ( $p < 0,05$ ) відсоткового вмісту NK-клітин з активаційним фенотипом та зниження відсотка NK-клітин, здатних активуватись при стимуляції TLR3 (рис. 11).

Аналіз імунологічних показників у динаміці також виявив відмінності між групами. У групі дітей, у якій не проводили профілактичне використання ЛЗ «Резістол®», достовірно знижувався як відносний вміст NK-клітин, так і відсоток цих клітин, здатних активуватись при стимуляції протівірусним рецептором TLR3 (рис. 12, 13).

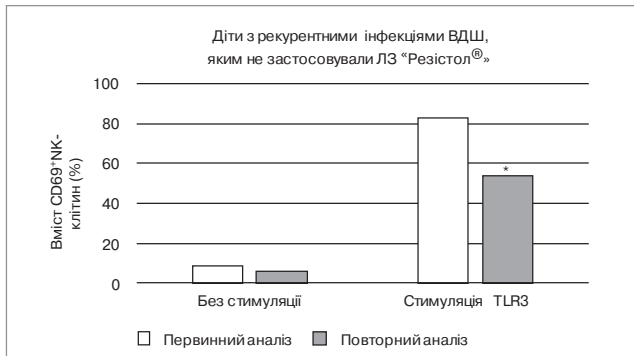
Аналіз імунологічних показників у динаміці також виявив відмінності між групами. У групі дітей, у якій не проводили профілактичне використання ЛЗ «Резістол®», достовірно знижувався як відносний вміст NK-клітин, так і відсоток цих клітин, здатних активуватись при стимуляції протівірусним рецептором TLR3 (рис. 12, 13).

Тобто у дітей з рекурентними інфекціями ВДШ з часом знижувався активаційний потен-



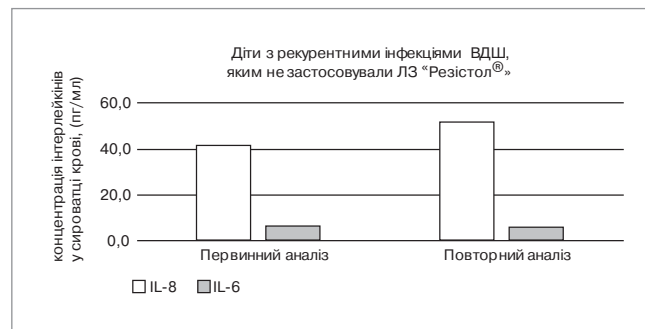
\* $p < 0,05$  – у порівнянні з первинним аналізом

**Рис. 12.** Зміни імунологічних показників у групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким не застосовували ЛЗ «Резістол»® (група 2а) з профілактичною метою (група 3)



\* $p < 0,05$  – у порівнянні з первинним аналізом

**Рис. 13.** Зміна відсоткового вмісту активованих CD69+ NK-клітин у групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким не застосовували ЛЗ «Резістол»® (група 2а) з профілактичною метою



**Рис. 14.** Концентрації сироваткових цитокінів IL-8 та IL-6 у групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким не застосовували ЛЗ «Резістол»® (група 2а)



**Рис. 15.** Концентрації сироваткових цитокінів IL-8 та IL-6 у групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким застосовували ЛЗ «Резістол»® (група 2б)

ціал протівірусної відповіді. Такі зміни можуть бути результатом функціонального виснаження імунних клітин після перенесення інфекцій, але водночас такий знижений активаційний потенціал створює сприятливі умови для повторних інфекцій.

Як і в групах дітей з ГРВІ, у групах дітей з рекурентними інфекціями ВДШ порівняльний аналіз концентрації сироваткових цитокінів не виявив достовірних змін (рис. 14, 15).

Таким чином, у дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, яким призначався «Резістол»®, відсоток NK-клітин, що здатні активуватись при стимуляції TLR-3, залишався сталим, тоді як в групі дітей, які не отримували препарат з профілактичною метою, відбувалося зниження цього показника та відсоткового вмісту активованих NK-клітин.

### Обговорення результатів науково-дослідної роботи

Результати науково-дослідної роботи з вивчення стану клітинного імунітету у дітей з ГРВІ та рекурентними інфекціями ВДШ, а також з вивчення впливу ЛЗ «Резістол»®, краплі оральні (ПАТ «Галичфарм», Україна) на активність імунного захисту продемонстрували, що суттєві достовірні зміни в показниках клітинного імунітету відбувались саме в групі

дітей, які на момент проведення роботи були хворі на ГРВІ: у дітей, яким проводилось лікування ГРВІ з використанням ЛЗ «Резістол»®, достовірно збільшувалась абсолютна кількість лейкоцитів за рахунок лімфоцитів – клітин, які переважно залучені до елімінації вірусних патогенів; зростала кількість NK-клітин, що здатні активуватись при стимуляції TLR3 та які можуть безпосередньо розпізнавати вірусні патогени. Порівняння результатів дослідження клітинного імунітету в групах дітей з ГРВІ дозволяє зробити висновок, що біологічно активні складові ЛЗ «Резістол»® мають імуномодулюючі властивості для покращення відповіді клітинного імунітету у дітей з ГРВІ. Враховуючи добру переносимість ЛЗ, відсутність зареєстрованих у дослідженні побічних реакцій та ускладнень, ЛЗ «Резістол»® можна вважати дієвим та безпечним імуномодулюючим ЛЗ в умовах гострого респіраторного захворювання у дітей.

Діти з рекурентними інфекціями ВДШ, у яких не використовувався ЛЗ «Резістол»®, продемонстрували достовірне зниження як відсоткового вмісту NK-клітин, так і відсотка цих клітин, що здатні активуватись при стимуляції протівірусним рецептором TLR3. А от в групі дітей з рекурентними інфекціями ВДШ, які



отримували 21-денний курс ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>», даний ЛЗ продемонстрував здатність підтримувати активаційний потенціал НК-клітин, можливо, попереджуючи таким чином функціональне виснаження ланки противірусного імунітету. Як було наведено вище, у дітей з рекурентними інфекціями ВДШ зафіксовано зниження активаційного потенціалу противірусної відповіді, що може бути результатом функціонального виснаження імунних клітин після перенесення інфекцій. Але однозначним є те, що такий знижений активаційний потен-

ціал противірусної відповіді створює сприятливі умови для розвитку повторних інфекцій.

Тобто найбільш активно свої імуномодуючі властивості та вплив на підвищення здатності «знищувати» віруси клітинною ланкою імунітету ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>» продемонстрував в умовах гострого перебігу інфекційного захворювання. Дітям з рекурентними інфекціями ВДШ 21-денний курс ЛЗ «Резістол<sup>®</sup>» дає можливість підтримати активаційний потенціал НК-клітин, імовірно, попереджуючи таким чином функціональне виснаження ланки противірусного імунітету.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Квашнина ЛВ, Матвиенко ИН, Родионов ВП, Маковская ЮА, Игнатова ТБ. (2015). Применение лекарственного средства Резистол у детей с острыми и хроническими инфекциями дыхательных путей и носоглотки. Педиатрия. Восточная Европа. 3(11):2—15.
2. Чернишова ЛЛ, Волоха АП. (2013). Дитяча імунологія. Київ: Медицина.
3. Bellomo R, Bagshaw SM. (2006). Evidence-based medicine: classifying the evidence from clinical trials — the need to consider other dimensions. Crit Care. 10(5): 232.
4. Calvo M, Grob K, Bertoglio J et al. (1990). Secretory IgA deficiency in pediatric patients: clinical and laboratory follow-up. Allergol Immunopathol (Madr.). 18;3:149—153.
5. CD69 molecule (Homo sapiens (human)). (2006). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/969>.
6. Chew V, Tow C, Huang C et al. (2012). Toll-Like Receptor 3 Expressing Tumor Parenchyma and Infiltrating Natural Killer Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. J Natl Cancer Inst. 104:1796—1807.
7. Conrad A, Hansmann C, Engels I et al. (2007, March 5). Extract of Pelargonium sidoides (EPs<sup>®</sup> 7630) improves phagocytosis, oxidative burst, and intracellular killing of human peripheral blood phagocytes in vitro. Phytomedicine. 14;1:46—51.
8. Conrad A, Jung I, Tioua D et al. (2007). Extract of Pelargonium Sidoides (EPs 7630) inhibits the interactions of group A-streptococci and host epithelia in vitro. Phytomedicine. 14;VI:52—59.
9. Gonzales C, Williams C, Calderon V. et al. (2012). Antibacterial Role for Natural Killer Cells in Host Defense to Bacillus anthracis. Infect Immun. 80:234—242.
10. Gouloupoulou S, McCarthy C, Webb R. (2016). Toll-like Receptors in the Vascular System: Sensing the Dangers Within. Pharmacol Rev. 68:142—67.
11. Guillerey C, Chow M, Miles K et al. (2015). Toll-like receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. Oncoimmunology. 4:e1027468.
12. Guo Q, Zhang C. (2012). Critical role of Toll-like receptor signaling in NK cell activation. Chin. Sci. Bull. 57:3192.
13. Kayser O, Kolodziej H, Kiderlen AF. (2001). Immunomodulatory principles of Pelargonium Sidoides. Phytother Res. 15:122—126.
14. Koch E, Biber A. 2007 Treatment of rats with Pelargonium Sidoides extract EPs 7630 has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin. Phytomedicine. 14;VI:40—45.
15. Kolodziej H, Kayser O, Radtke OA, Kiderlen AF. (2003) Pharmacological profile of extracts of Pelargonium Sidoides and their constituents. Phytomedicine. 10;VI:18—24.
16. Kolodziej H, Kiderlen AF. (2007). In vitro evaluation of antibacterial and immunoflammatory activities of Pelargonium reniforme, Pelargonium Sidoides and the related herbal drug preparation EPs 7630. Phytomedicine. 14;VI:18—26.
17. Kolodziej H, Schulz V. (2003). EPs 7630: From traditional application to modern phytodrug. Deutsche Apotheker Zeitung. 143:55—64.
18. Lizogub VG, Riley DS, Heger M. (2007). Efficacy of a Pelargonium sidoides preparation in patients with the common cold: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Explore. 3:573—584.
19. Moore T, Kumm P, Brown D, Petro T. (2014). Interferon Response Factor 3 is crucial to poly-I:C induced NK cell activity and control of B16 melanoma growth. Cancer Lett. 346:122—128.
20. Raulet D. (2006). Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. Semin Immunol. 18:145—150.
21. Wines BD, Hogarth PM. (2006). IgA receptors in health and disease. Tissue Antigens. 68;2:103—114.
22. Woof JM, Kerr MA. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. J. Pathol. 208;2:270—282.
23. Wulff S, Pries R, Wollenberg B. (2010). Cytokine release of human NK cells solely triggered with Poly I:C Cell Immunol. 263(2):135—7.

## Сведения об авторах:

**Квашнина Людмила Викторовна** — д.мед.н., проф., руководитель отделения медицинских проблем здорового ребенка и преморбидных состояний ГУ «ИПАГ имени акад. Е.Н. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8.

**Чернышев Виктор Павлович** — д.мед.н., проф., руководитель лаборатории иммунологии с научной группой вирусологии ГУ «ИПАГ имени акад. Е.Н. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8.

**Матвиенко Ирина Николаевна** — к.мед.н., с.н.с. детского консультативно-диагностического центра ГУ «ИПАГ имени акад. Е.Н. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8.

**Игнатова Татьяна Борисовна** — к.мед.н., с.н.с. детского консультативно-диагностического центра ГУ «ИПАГ имени акад. Е.Н. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8.

**Осипчук Дарья Витальевна** — к.б.н., ГУ «ИПАГ имени акад. Е.Н. Лукьяновой НАМН Украины». Адрес: г. Киев, ул. П. Майбороды, 8.

Статья поступила в редакцию 12.08.2018, принята к печати 10.12.2018.