

Министерство образования и науки Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Московский физико-технический институт (государственный университет)»
Факультет биологической и медицинской физики
Кафедра молекулярной медицины

На правах рукописи

УДК 615.273.3

**Варианты ответа нейтрофильных гранулоцитов на иммуотропные
препараты у больных вторичным иммунодефицитом по НСТ-тесту**

Магистерская диссертация

Направление подготовки 030401 Прикладные математика и физика
Магистерская программа 010982 Физико-химическая биология и
биотехнология

Заведующий кафедрой Говорун Вадим Маркович, д.б.н., профессор, член-корр. РАН

/ _____ /

Научный руководитель Дидковский Николай Антонович, д.м.н., профессор

/ _____ /

Научный консультант Говорун Вадим Маркович, д.б.н., профессор, член-корр. РАН

/ _____ /

Студент Савилова Анастасия Григорьевна

/ _____ /

г. Москва

2015

1. ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	4
3. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
4. ВВЕДЕНИЕ.....	7
4.1 Актуальность проблемы.....	7
4.2 Цель работы.....	9
4.3 Задачи работы.....	9
5. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
5.1 Вторичные иммунодефицитные состояния.....	11
5.2 Хронические воспалительные заболевания.....	15
5.3 Нейтрофилы.....	17
5.4 Иммуотропные препараты.....	19
5.4.1 Антиоксиданты.....	19
5.4.2 Тимоиметики.....	21
5.4.3 Интерфероны/индукторы интерферонов.....	22
6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	24
6.1 Характеристика пациентов.....	24
6.2 Приборы и материалы.....	24
6.3 Растворы и реактивы.....	25
6.4 Определение восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами спектрофотометрически (НСТ-тест)	26

6.5	Статистическая обработка результатов.....	29
7.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	30
7.1	Влияние антиоксидантов на функциональную активность нейтрофилов.....	30
7.2	Влияние тимомиметиков на функциональную активность нейтрофилов.....	34
7.3	Влияние интерферонов/индукторов интерферонов на функциональную активность нейтрофилов.....	39
8.	ВЫВОДЫ.....	45
9.	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	46

2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Вторичные иммунодефицитные состояния — нарушения иммунной системы, развивающиеся в позднем постнатальном периоде или у взрослых, не являющиеся результатом генетических дефектов.

Нейтрофилы — сегментоядерные и палочкоядерные нейтрофильные гранулоциты.

НСТ-тест — фотометрический тест восстановления нитросинего тетразолия.

Спонтанный НСТ-тест — НСТ-тест проводящийся с в цельной крови

Индукцированный НСТ-тест — НСТ-тест проводящийся в цельной крови с нейтрофилами, активированными убитой автоклавированием культурой *S.aureus* в концентрации 1 млн/мл

Индекс активации нейтрофилов, индекс стимуляции — отношение показателя, индуцированного НСТ-теста к показателю спонтанному НСТ-теста (для одного и того же пациента)

Контроль, изначальное значение — значение показателей НСТ-теста, таких как спонтанный НСТ-тест, индуцированный НСТ-тест, индекс активации нейтрофилов, без воздействия лекарственного препарата.

Полиоксидоний® — торговое название лекарственного препарата, содержащего азоксимера бромид

Имунофан® — торговое название лекарственного препарата, содержащего аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин

Глутоксим[®] — торговое название лекарственного препарата,
содержащего глутамил-цистеинил-глицин динатрия

Тимоген[®] — торговое название лекарственного препарата,
содержащего альфа-глутамил-триптофан

Тактивин[®] — торговое название лекарственного препарата,
содержащего тимуса экстракт

Интрон-А[®] — торговое название лекарственного препарата,
содержащего интерферон альфа-2b

Циклоферон[®] — торговое название лекарственного препарата,
содержащего меглюмина акридонацетат

3. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВИДС — вторичное иммунодефицитное состояние

ЖКТ — желудочно-кишечный тракт

СПИД — синдром приобретенного иммунодефицита

ХВЗ — хроническое воспалительное заболевание

АОЗ — антиоксидантная защита

НАДФН — восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

АФК — активные формы кислорода

ОРЗ — острое респираторное заболевание

НФ — нейтрофил

УФ-излучение — ультрафиолетовое излучение

НСТ-тест – тест восстановления нитросинего тетразолия

сНСТ — спонтанный НСТ-тест

иНСТ— индуцированный убитой автоклавированием культурой *S.aureus* (в концентрации 1 млн./мл) НСТ-тест

ИС – индекс активации нейтрофилов

ДМСО — диметилсульфоксид

PBS — фосфатно-солевой буфер

4. ВВЕДЕНИЕ

4.1. Актуальность проблемы

Иммунная система сложнейшая защитная система животных и человека, обеспечивающая многоступенчатую защиту от окружающих его повреждающих агентов. За последнее время на фоне ухудшающейся экологической ситуации зарегистрировано увеличение числа пациентов с соматическими и онкологическими заболеваниями, сопровождающимися развитием иммунодефицита. Вторичные иммунодефицитные состояния (ВИДС) являются, вероятно, мультифакториальными по своему происхождению. Большая роль отводится неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды на организм человека, в зоне экологического неблагополучия, каждый 10 житель имеет ту или иную разновидность иммунодефицита [1]. Известно, что у людей старшего возраста происходит ослабление иммунитета вследствие инволюции тимуса [2]. Таким образом, увеличение продолжительности жизни и доли старшего поколения в популяции [3] также влечет за собой абсолютное увеличение количества случаев ВИДС. Широкая распространенность ВИДС, отсутствие четких лабораторных критериев диагностики и знания узловых звеньев патогенеза ВИДС затрудняют их своевременное выявление и лечение. [4]. Несостоятельность иммунной системы ведет к развитию хронического инфекционного синдрома, а также возникновению аллергии, псевдоаллергии, аутоиммунных заболеваний, онкопатологий, в том числе

лимфопролиферативных заболеваний, что в свою очередь значительно ухудшает качество жизни отдельно взятого человека. В связи с этим особую актуальность приобретает изучение препаратов, способных скорректировать действие иммунной системы таким образом, чтобы она восстановила свое нормальное функционирование.

Несмотря на большое разнообразие иммунокорректоров до сих пор чаще всего их назначение основывается лишь на данных иммунограммы, отражающей какие звенья иммунной системы несостоятельны у данного пациента, и общей клинической картины заболевания, которое явилось причиной возникновения ВИДС, но каждый организм реагирует на любое лекарственное средство с присущей ему индивидуальностью. Вследствие этого нередко в практике применения иммунокорректоров случаи, когда они либо совсем не оказывают воздействия, либо же являются причиной тяжелых осложнений, обусловленных развитием дисфункции иммунной системы, избыточного воспалительного процесса, интоксикации и существенно ухудшают прогноз болезни. Всё это ведет к дискредитации иммунокорректирующих препаратов и отказу от их включения в комплексную терапию болезней, протекающих на фоне клинических признаков ВИДС, несмотря на то, что на сегодняшний день можно считать установленным, что ни при одном из патологических состояний, сопровождающегося приобретенной вторичной иммунной недостаточностью, лечение не может проводиться адекватно без применения иммунокорректирующих препаратов

[5]. Отказ от иммунотерапии ведет к значительному ухудшению протекания основного заболевания и подчас является причиной его затяжного лечения [6].

Исходя из вышесказанного, становится очевидным, что в настоящее время необходим простой в исполнении, недорогой и достоверный метод, который позволит оценить индивидуальную чувствительность пациента к тому или иному препарату с целью дальнейшего назначения эффективной иммунокорректирующей терапии. В последние годы фотометрический тест восстановления нитросинего тетразолия (НСТ – тест) получил распространение в клинической практике и научных исследованиях как в России [7, 8, 9, 10], так и за рубежом [11, 12], и стал одним из важных методических подходов ввиду экономичности, упрощения постановки и большей надежности по сравнению с визуальным НСТ – тестом [13, 14]. НСТ – тест в фотометрической постановке, за счет использования иммунологических планшетов, позволяет исследовать действие нескольких препаратов, а также различных доз для нескольких пациентов одновременно. Тест отражает суммарную продукцию активных форм кислорода нейтрофилами и позволяет оперативно оценить изменение активности нейтрофилов периферической крови пациентов с ВИДС в ответ на воздействие на них иммуностропных препаратов. Изучение влияния иммуностропных препаратов на функциональную активность нейтрофилов у больных ВИДС, представляется важным также для выявления новых

возможностей их применения, расширения показаний. Таким образом, изучение влияния иммуностропных препаратов на активность нейтрофилов *in vitro* представляет значительный научный и практический интерес.

4.2. Цель работы

Изучить влияние иммуностропных препаратов различных групп на функциональную активность нейтрофилов периферической крови пациентов, страдающих ВИДС с помощью фотометрического НСТ-теста.

4.3. Задачи работы

1. По данным НСТ-теста изучить влияние иммуностропных препаратов-антиоксидантов на спонтанную и индуцированную кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов у больных, страдающих ВИДС.
2. По данным НСТ-теста Изучить влияние фармакологических препаратов интерферонов/индукторов интерферонов, на показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста у больных, страдающих ВИДС.
3. Изучить с помощью НСТ-теста воздействие тимомиметиков, на спонтанную и индуцированную кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов у больных, страдающих ВИДС.
4. Определить значение различных показателей НСТ-теста – сНСТ, иНСТ, ИС – для оценки эффективности иммуностропной терапии.

5. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

5.1. Вторичные иммунодефицитные состояния

Проблема диагностики и лечения иммунодефицитных состояний является в настоящее время чрезвычайно актуальной для клинической медицины. Это обусловлено тем, что в последние годы накопилось большое количество новых сведений о строении и функционировании иммунной системы человека, иммуномодулирующая терапия стала активно внедряться в практику не только врачей иммунологов, но и врачей других специальностей, появилось множество новых иммуномодулирующих препаратов, увеличилось число нозологических форм, в лечении которых применяются иммуотропные средства.

Все иммунодефицитные состояния принято разделять на первичные и вторичные. Первичные иммунодефициты — это врожденные заболевания, обусловленные дефектами генов, контролирующих иммунный ответ; при этом дефект может затрагивать один или несколько компонентов системы иммунитета: клеточный и гуморальный иммунитет, фагоцитоз, систему комплемента. Для них характерны стойкие нарушения иммунных параметров. Клинически первичные иммунодефициты проявляются рецидивирующими инфекционными заболеваниями, склонностью к аутоиммунной патологии, опухолевым заболеваниям. Эти иммунодефициты дебютируют, как правило, в раннем детском возрасте.

Вторичными иммунодефицитными состояниями называют нарушения иммунной системы, развивающиеся в позднем постнатальном периоде или у взрослых, не являющиеся результатом генетических дефектов.

Клиническими признаками ВИДС являются хронические, часто рецидивирующие, вялотекущие, трудно поддающиеся лечению традиционными средствами инфекционновоспалительные заболевания любой локализации, вызванные оппортунистическими или условно патогенными микроорганизмами, а также патогенной флорой с атипичными биологическими свойствами и/или множественной устойчивостью к антибиотикам.

Выделяют три формы ВИДС: приобретенную, индуцированную и спонтанную. Наиболее типичной приобретенной формой вторичного иммунодефицита является СПИД, развивающийся в результате поражения лимфоидной ткани человека вирусом. При спонтанной форме вторичного иммунодефицита явную причину нарушения иммунной реактивности выявить не удастся (в ряде случаев это связано с недостаточными диагностическими возможностями современной клинической медицины).

Факторы, способные вызвать индуцированный вторичный иммунодефицит, весьма разнообразны. ВИДС может быть вызвано как факторами внешней среды, так и внутренними факторами организма, например, рецидивирующие бактериальные, грибковые, вирусные инфекции различной локализации, аллергопатология (атопический дерматит,

бронхиальная астма, поллиноз, экзема с инфекционным синдромом), аутоиммунная патология, новообразования разной локализации; болезни крови, патология ЖКТ, патология эндокринной системы, старение, хирургические вмешательства, травмы; нарушения питания, цитостатическая терапия. [15].

В целом, все неблагоприятные факторы окружающей среды, способные нарушить обмен веществ организма, могут стать причиной развития ВИДС. К наиболее распространенным факторам окружающей среды, вызывающим иммунодефицит, относятся загрязнения окружающей среды, ионизирующее и СВЧ-излучение, острые и хронические отравления [16], длительный прием некоторых лекарственных препаратов, хронический стресс и переутомление. [17] Общей чертой описанных выше факторов является комплексное негативное воздействие на все системы организма, в том числе и на иммунную систему. Кроме того, такие факторы, как ионизирующее излучение, оказывают избирательное ингибирующее действие на иммунитет, связанное с угнетением системы кроветворения. Люди, проживающие или работающие в условиях загрязненной окружающей среды, чаще болеют различными инфекционными заболеваниями и чаще страдают онкологическими болезнями [18]. Очевидно, что такое повышение заболеваемости у этой категории людей связано со снижением активности иммунной системы.

Состояние иммунной системы имеет большое значение для формирования инфекционной резистентности. Главная задача противоинфекционной системы защиты — элиминировать инфекционные агенты, сохранив память о них (лимфоциты памяти) для более быстрого и эффективного реагирования в случае повторного заражения. Развитие хронического заболевания свидетельствует о том, что в сложной системе защиты организма есть сбои в функционировании. При инфицировании факторы естественной резистентности включаются мгновенно и на ранних этапах являются практически единственными защитниками организма. Только через 2–3 недели начинают функционировать элементы специфической защиты. В динамике развития заболевания эти две составляющие защитной реакции организма (врожденный и приобретенный иммунитет) функционируют параллельно, дополняя и усиливая друг друга [2].

Диагностика ВИДС в клинической практике очень важна, поскольку наличие иммунодефицита диктует необходимость применения иммуностропных препаратов для получения максимального терапевтического эффекта. Количество клинических ситуаций, в которых оправданно включение иммуномодуляторов в состав комплексной терапии пациентов, довольно велико [19, 20].

5.2. Хронические воспалительные заболевания

Среди хронических воспалительных заболеваний (ХВЗ) наиболее распространенными являются респираторные заболевания; их осложнения и хронизации до настоящего времени наносят существенный ущерб здоровью населения и экономике стран во всем мире.

Патогенез респираторных заболеваний складывается из комплекса процессов, развивающихся на всех этапах репродукции возбудителей и их распространения в организме, а также процессов, развивающихся при взаимоотношении возбудителей с защитными системами хозяина, то есть с компонентами врожденного и приобретенного иммунитета. На внедрение возбудителя организм отвечает сложной системой защитно-приспособительных реакций, направленных на ограничение его репродукции и последующую элиминацию, а в конечном итоге, на полное восстановление возникающих структурно-функциональных нарушений.

На раннем этапе наблюдается увеличение числа лимфоцитов, особенно нейтрофилов в очаге воспаления, и усиление их фагоцитарной активности, сопровождающейся перестройкой метаболизма клеток: увеличение ионной проницаемости клеточной мембраны, усиление окисления глюкозы и резкое - в десятки раз - возрастание потребления кислорода, сопровождающееся гиперпродукцией свободных радикалов, в том числе генерации супероксид анион-радикала O_2^- , галогенов, H_2O_2 . Выраженность клинических симптомов заболевания определяется степенью активности иммунных реакций.

Повышение кислородозависимого метаболизма, с одной стороны, представляет собой проявление защитных реакций, но с другой – длительная активация нейтрофилов с накоплением большого количества свободных радикалов, особенно генерации супероксиданион радикала O_2^- , может привести к их повреждающему действию на ткани, в том числе и на сами фагоциты, приводить к осложнениям [21]. В реакциях, протекающих с участием свободных радикалов, усиливаются процессы перекисного окисления липидов, протеолипидов, белков клеточных структур и даже нуклеиновых кислот. Запускается процесс нарушения липидного слоя клеточных мембран эпителия верхних отделов респираторного тракта и легких, его сурфактантного слоя, нарушаются матричные и барьерные свойства внутриклеточных мембран, увеличивается их проницаемость и развивается дезорганизация жизнедеятельности клетки вплоть до ее гибели. Разрушительному действию свободных радикалов и образующихся при этих химических превращениях перекисных соединений препятствует сложная многокомпонентная буферная система антиоксидантной защиты (АОЗ), которая снижает скорость их образования, прерывает цепные реакции, уменьшает концентрацию продуктов их трансформации, тем самым предотвращая развитие болезни. Чрезмерная активация свободнорадикальных процессов может привести к истощению АОЗ, а уменьшение емкости антиоксидантной системы неизбежно отразится на

развитии инфекционного процесса [22], что говорит о важности правильно подобранной терапии, в том числе, иммунокорректирующей.

5.3.Нейтрофилы.

Нейтрофильные сегментоядерные лейкоциты (нейтрофильные гранулоциты, или нейтрофилы) — преобладающая популяция белых клеток крови. В крови человека содержится $2,0-7,5 \times 10^9/\text{л}$ нейтрофилов, что составляет 50–70% от общего числа лейкоцитов крови; также в крови присутствует некоторое количество ($0,04-0,3 \times 10^9/\text{л}$, т.е. 1–6%) палочкоядерных форм нейтрофилов, не завершивших созревание. Ядро таких клеток не сегментировано. Диаметр нейтрофилов составляет 9–12 мкм. Им свойственна уникальная морфология: ядро сегментированное (обычно состоит из 3 сегментов) с плотно упакованным хроматином (гетерохроматином); цитоплазма содержит нейтральные (по данным окрашивания) гранулы, что и определяет название этих клеток. Наибольшее своеобразие свойственно гранулам нейтрофилов.

Различают 4 разновидности гранул этих клеток: азурофильные (первичные), специфические (вторичные), желатиновые (третичные) и секреторные везикулы. Специфические гранулы содержат ферменты, проявляющие свою активность при нейтральных и слабощелочных значениях pH: лактоферрин, щелочную фосфатазу, лизоцим, в специфических гранулах содержится большое количество фермента НАДФН-оксидазы, катализирующего «кислородный взрыв» и образование

активных форм кислорода — главных факторов бактерицидности фагоцитов. Азурофильные гранулы содержат широкий набор гидролаз и других ферментов, активных при кислых значениях рН. Желатиназные (третичные) гранулы в соответствии с названием содержат желатиназу. Наконец, четвертый тип гранул — секреторные везикулы — содержат щелочную фосфатазу. При стимуляции нейтрофилов в первую очередь происходит высвобождение содержимого секреторных пузырьков. Преодолевать базальные мембраны нейтрофилам позволяет секрет желатиназных гранул. Специфические, а затем азурофильные гранулы сливаются с фагосомами в процессе фагоцитоза (через 30 с и 1–3 мин после поглощения частицы соответственно).

Комплекс бактерицидных факторов, присутствующих в гранулах, обеспечивает разрушение многих микроорганизмов. Наиболее эффективно содержимое гранул повреждает стрептококки, стафилококки и грибы (включая кандиды). Содержимое гранул, особенно азурофильных, может секретироваться в результате дегрануляции. После дегрануляции восстановления гранул не происходит. Наряду с моноцитами/макрофагами нейтрофилы рассматривают как основные фагоцитирующие клетки. При этом нейтрофилы мигрируют из крови в очаг воспаления значительно быстрее моноцитов. Скорость мобилизации нейтрофилов дополняется их способностью развивать метаболические процессы («кислородный взрыв») в течение секунд. Все это делает нейтрофилы оптимально приспособленными

для осуществления ранних этапов иммунной защиты в рамках острой воспалительной реакции [2].

5.4. Иммуотропные препараты

Существуют различные классификации иммунокорректоров, например, в зависимости от происхождения и природы, по преимущественному действию на те или иные клетки или звено иммунитета, по фармакологическому действию. В данном исследовании сравнивалось действие иммунокорректоров на функциональную активность нейтрофилов, т.е. так или иначе воздействующие на моноцитарно-макрофагальное звено. При этом сравниваемые друг с другом препараты имели схожее фармакологическое действие.

5.4.1. Антиоксиданты

Повышенное образование АФК (обеспечивают бактерицидность нейтрофилов) в условиях воспалительного процесса и интоксикации приводит к истощению антиоксидантной защиты (АОЗ) и развитию оксидативного стресса. Может возникать каскадоподобное повреждение мембран клеток пораженного органа и клеток иммунной системы. Существует целый ряд препаратов разной химической природы, которые способны подавлять процессы образования свободных форм кислорода (радикалов). Одни препараты нейтрализуют образовавшиеся радикалы и выводят их из организма, другие — способствуют восстановлению АОЗ [23].

Азоксимера бромид (Полиоксидоний®)

Фармакологическое действие - детоксицирующее, антиоксидантное, иммуномодулирующее. Увеличивает резистентность организма в отношении локальных и генерализованных инфекций. Основой механизма иммуномодулирующего действия - прямое воздействие на фагоцитирующие клетки и естественные киллеры. Активирует фагоциты периферической крови и тканевые макрофаги, восстанавливает иммунные реакции при вторичных иммунодефицитных состояниях, ингибирует перекисное окисление липидов [24].

Аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин (Имунофан®)

Фармакологическое действие - дезинтоксикационное, гепатопротективное, антиоксидантное, иммуномодулирующее. Препарат вызывает инактивацию свободнорадикальных и перекисных соединений. Корректирует состояние иммунной системы, восстанавливает баланс окислительно-антиокислительных реакций организма. Нормализует перекисное окисление липидов, ингибирует распад фосфолипидов клеточной мембраны, активирует фагоцитоз [25].

Глутамил-Цистеинил-Глицин динатрия (Глутоксим®)

Фармакологическое действие — регулирующее окислительно-восстановительные процессы, гемопоэтическое, гепатопротективное, иммуномодулирующее. Воздействует на окислительно-восстановительный метаболизм клетки, стимулирует эндогенную продукцию цитокинов,

активирует фагоцитоз, в том числе, при иммунодефицитах, восстанавливает в периферической крови уровень нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов, функциональную активность тканевых макрофагов. Восстанавливает естественный противоопухолевый и противоинфекционный иммунитет [26]. Усиливает дегрануляцию нейтрофилов [27].

5.4.2. Тимомиметики

Препараты этой группы оказывают стимулирующее влияние как на лимфоциты, так и на фагоциты [23].

Альфа-глутамил-триптофан (Тимоген®)

Синтетический дипептид, состоящий из остатков аминокислот — глутамина и триптофана. Разработан в НИИ ФХМ ФМБА России. Фармакологическое действие - иммуномодулирующее. Стимулирует клеточные факторы иммуногенеза, пролиферацию и дифференцировку предшественников Т-лимфоцитов в зрелые иммунокомпетентные клетки, нормализует соотношение Т-хелперы/Т-супрессоры, стимулирует интерферогенез и функцию естественных киллеров (в низких дозах). Обладает антимицитарными свойствами. Высокоэффективен при иммунодефицитах Т-супрессорного типа. Усиливает неспецифическую резистентность организма, способствует активации фагоцитарных функций нейтрофилов и моноцитов/макрофагов [28, 29].

Тимуса экстракт (Тактивин®)

Фармакологическое действие — иммуностимулирующее. При иммунодефицитных состояниях препарат нормализует количественные и функциональные показатели иммунитета. Активизирует макрофагальную систему [30, 31].

5.4.3. Интерфероны/индукторы интерферонов

Иммунокоррекция при недостаточности интерферогенеза в зависимости от стадии болезни и выраженности дефицита интерферонов проводится с использованием как заместительной иммунотерапии рекомбинантным интерфероном, так и индукторов интерферонов [32].

Интерферон альфа-2b (Интрон-А®)

Фармакологическое действие - противовирусное, иммуномодулирующее, противоопухолевое, антипролиферативное. Препятствует вирусному инфицированию клеток. Стимулирует процесс презентации антигена иммунокомпетентным клеткам, модулирует активность киллеров, участвующих в противовирусном иммунитете. По данным литературы под влиянием интерферона альфа-2b происходит ингибирование респираторного взрыва [33]. Установлено, что Интрон-А оказывает иммуностимулирующее воздействие на нейтрофилы крови человека и нивелирует иммунодепрессивное действие некоторых доз УФ-излучения [34].

Меглюмина акридонацетат (Циклоферон®)

Фармакологическое действие — интерферониндуцирующее.

Низкомолекулярный индуктор интерферона с широким спектром биологической активности (в том числе противовирусная, иммуномодулирующая, противовоспалительная, антипролиферативная, противоопухолевая). эффективен в отношении вирусов герпеса, гриппа и других возбудителей ОРЗ. Повышает неспецифическую резистентность организма в отношении вирусных и бактериальных инфекций. [35, 36].

6. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

6.1. Характеристика пациентов

У больных, чья кровь послужила материалом для исследования, наблюдались клинические признаки вторичного иммунодефицита, которые выражались в появлении очагов хронической инфекции бактериального и вирусного происхождения различной локализации. Наиболее характерно поражение слизистых оболочек дыхательных путей (фарингит, ринит, синуситы, трахеит, отит, бронхит) и мочеполовой системы (вагинит, аднексит, простатит, уретрит, цистит и т.д.), желудочно-кишечного тракта (дисбактериоз кишечной флоры). Поражение кожных покровов преимущественно грибковой инфекцией, рецидивирующими гнойничковыми высыпаниями, фурункулезом. У больных отмечаются частые ОРВИ (более 5-6 раз в год), характеризующиеся упорным течением, плохо поддающиеся стандартной терапии. Характерно указание в анамнезе на проведение многократных курсов антибактериальной терапии, по поводу инфекций различного генеза и локализации.

Кровь для определения продукции активных форм кислорода (АФК) брали один раз натощак из локтевой вены в стерильные вакуумные пробирки, содержащие гепарин.

6.2. Приборы и материалы

1. Планшетный фотометр - Stat Fax 210[®] «Stat Fax» (США)
2. Шекер термостатируемый СТЗ Вошер[®] «Stat Fax» (США)

3. Автоматические пипетки переменного объема 20-1000 мкл «Ленпипет» (Россия)
4. Плоскодонные планшеты для ИФА «Медполимер» (Россия)
5. Пробирки 2 мл «Eppendorf» (Германия)
6. Наконечники для пипеток до 20 мкл «Eppendorf» (Германия)
7. Наконечники для пипеток до 200 мкл «Eppendorf» (Германия)
8. Пробирки Vacutest® «КИМА» (Италия)

6.3. Растворы и реактивы

1. НСТ «Sigma-Aldrich» (США)
2. Суспензия S.aureus в концентрации 1 млн./мл, убитых автоклавированием (приготовлена в бактериологической лаборатории ГКБ № 7)
3. Таблетки фосфатно-солевой буфер рН 7,4 «ПанЭко» Россия
4. ДМСО 99% «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга» (Россия)
5. КОН «Sigma-Aldrich» (США)
6. Азоксимера бромид — Полиоксидоний® раствор для приготовления лекарственных форм и вакцин «Петровакс фарм НПО» (Россия)
7. Аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин — Имунофан® раствор для внутримышечного и подкожного введения «Бионокс» (Россия)
8. Глутамил-цистеинил-глицин динатрия — Глутоксим® раствор для инъекций ЗАО «ФАРМА ВАМ» (Россия)

9. Альфа-глутамил-триптофан — Тимоген[®] раствор для инъекций НПО «Биомед» (Россия)
10. Тактивин — Тактивин[®] раствор подкожного введения «Биомед им. И.И. Мечникова» (Россия)
11. Интерферон альфа-2b — Интрон-А[®] раствор для внутривенного и подкожного введения «Вектор-Медика» (Россия)
12. Меглюмина акридонацетат — Циклоферон[®] Раствор для внутривенного и внутримышечного введения «ПОЛИСАН» (Россия)

6.4. Определение восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами спектрофотометрически (НСТ-тест).

Тест отражает суммарную продукцию АФК нейтрофилами. В основе метода лежит способность восстановления поглощенного фагоцитом красителя нитросинего тетразолия в диформазаан под влиянием активных форм кислорода. Очевидно, что концентрация НФ у людей индивидуальна. Соответственно, полученные величины оптической плотности в НСТ-тесте зависят не только от функционального состояния клеток, но и от их концентрации, по этой причине, показатели НСТ-теста нормировали на 10000 клеток, при этом заметим, что индивидуальная концентрация НФ не важна для определения ИС — отношения показателей спонтанного (сНСТ) и индуцированного НСТ-теста (иНСТ) для одного и того же человека. Из литературы известно, что при инкубации в течении 30 минут при 37⁰С процент адгезированных к иммунологическому планшету нейтрофилов в

спонтанном и индуцированном НСТ-тесте не различается [37], таким образом возможное изменение адгезии НФ под влиянием препаратов будет влиять на показания ИС лишь как на один из факторов вносящий вклад в функциональную активность НФ как обобщённый показатель.

Измерения проводили в цельной крови. Предварительно 500 мкл крови разливали в пробирки, добавляли растворы исследуемых препаратов в концентрациях, соответствующих средним терапевтическим дозам [38]. Концентрации препаратов приведены в таблице 6.4.1.

В плоскодонные планшеты вносили и 20 мкл раствора НСТ 0,5 мг/мл на PBS (рН 7,4) на лунку с 20 мкл *S.aureus* в концентрации 1 млн./мл, убитых автоклавированием [39] для определения индуцированной продукции кислородных радикалов или 20 мкл PBS, для определения спонтанной продукции, и выдерживали в шейкере 10 мин при 140 об/мин для равномерного распределения раствора НСТ. Затем в лунки добавляли 50 мкл цельной крови (с растворами препаратов и без) и инкубировали 30 минут при 37°C. После этого клетки троекратно отмывали, добавляли по 100 мкл ДМСО (99%) и выдерживали в шейкере при 140 об/мин, при 50 °С, в течение 30 минут для выделения диформаза. Затем добавляли 100 мкл КОН (11 г/100 мл) – диформазан восстанавливался и приобретал синюю окраску. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=450$ нм. Результаты нормировались на 10000 клеток и для удобства обращения приводились в условные единицы (y.e.)

Показатели НСТ-теста (сНСТ, иНСТ) определялись как

$$\text{НСТ} = D \times \frac{10000}{\text{Количество НФ}} \times 100, \quad (1)$$

где D — значение оптической плотности, непосредственно определяемое с помощью спектрофотометра,

Количество НФ — количество нейтрофилов в 50 мкл периферической крови.

Индекс стимуляции рассчитывали, как отношение индуцированной активности к спонтанной. Нормы показателей НСТ-теста, принятые в лаборатории клинической иммунологии НИИ ФХМ ФМБА России приведены в таблице 6.4.2.

Таблица 6.4.1

Концентрации растворов препаратов, используемые в НСТ-тесте

Действующее вещество	Средняя терапевтическая доза, мг/70кг (млн МЕ/70кг)	Концентрация раствора, мкг/мл (тыс. ЕД/мл)
Азоксимера бромид	8	32
Аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин	20	40
Глутамил-цистеинил-глицин динатрия	50	200
Альфа-глутамил-триптофан	10	20
Тимуса экстракт	10	20
Интерферон альфа-2b	10 млн МЕ	4 тыс. ЕД/мл
Меглюмина акридонат	250	1000

Нормальные значения НСТ-теста

Спонтанный НСТ, у.е.	Индукцированный НСТ, у.е.	Индекс стимуляции
70-110	110-170	1,08-1,40

6.5. Статистическая обработка результатов

Данные полученные в результате исследования были статистически обработаны общепринятыми методами на ПК с использованием стандартных программ: STATISTICA 8.0, Microsoft Excel. В качестве статистических тестов использовали: однофакторный дисперсионный анализ для зависимых групп (single factor repeated measures ANOVA). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез считали $p = 0,05$.

7. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

7.1. Влияние антиоксидантных препаратов на функциональную активность нейтрофилов.

Для исследования были выбраны три препарата из данной группы: имунофан, полиоксидоний и глутоксим. Было проведено сравнение воздействия иммуностропных препаратов с антиоксидантными свойствами на кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов у больных ВИДС по НСТ-тесту в цельной крови *in vitro*. Статистически достоверные изменения наблюдались только для ИС. Это объясняется существенным разбросом исходных значений. В связи с этим, для дальнейшего анализа пациенты были разделены на три группы: с контрольными значениями ИС ниже нормы, нормальными и повышенными в контроле значениями. Результаты представлены в таблице 7.1.1. В данном разделе в таблицах, тексте обсуждения и на иллюстрациях используются торговые названия лекарственных средств

В группе пациентов с пониженными ИС ($0,81 \pm 0,03$, $n=105$) все исследуемые препараты восстанавливали ИС до нормы: Имунофан повышал ИС по сравнению с контролем на $22 \pm 8\%$ до $0,99 \pm 0,09$, ($p < 0,01$), Полиоксидоний - $24 \pm 7\%$ до $1,00 \pm 0,08$, ($p < 0,01$), Глутоксим - $24 \pm 9\%$ до $1,0 \pm 0,1$, ($p < 0,01$). (Рис.7.1.1)

Влияние иммунокорректоров с антиоксидантной активностью на индекс активации нейтрофилов.

Группа	Препарат	n	Контроль	Препарат
			ИС	
Ниже нормы	Имунофан	105	0,81±0,03	0,99±0,09*
	Полиоксидоний			1,00±0,08*
	Глутоксим			1,0±0,1*
Норма	Имунофан	42	1,217±0,004	1,01±0,07*
	Полиоксидоний			1,3±0,01
	Глутоксим			1,20±0,09
Выше нормы	Имунофан	48	1,9±0,1	1,3±0,3*
	Полиоксидоний			1,3±0,2*
	Глутоксим			1,4±0,2*

* $p < 0,01$

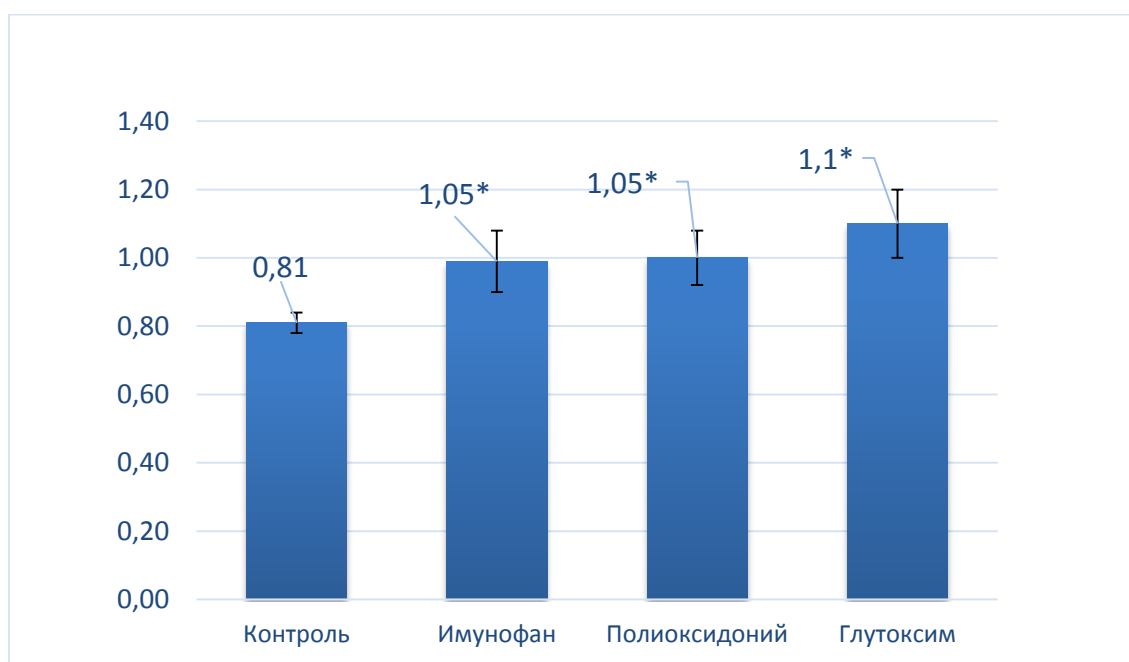


Рис. 7.1.1 Влияние иммунокорректоров с антиоксидантной активностью на индекс активации нейтрофилов для группы пациентов с исходным ИС ниже нормы.

В группе пациентов с изначально нормальными значениями ИС ($1,217 \pm 0,004$; $n=42$) только Имунофан оказывал на него достоверное влияние, понижая на $17 \pm 8\%$ до $1,01 \pm 0,07$, $p < 0,01$, по сравнению с изначальным

значением ИС (без влияния препарата). При этом, влияние двух других исследуемых препаратов на активность нейтрофилов отличалось от такового для имунофана. Для Полиоксидония на $29\pm 8\%$, для Глутоксима на $19\pm 9\%$. Так, после инкубации крови с Полиоксидонием ИС составил $1,3\pm 0,1$, $p < 0,01$ – достоверность различия ИС для Имунофана и Полиоксидония, а с Глутоксимом $1,20\pm 0,09$, $p < 0,05$ - достоверность различия ИС для Имунофана и Глутоксима. (Рис.7.1.2)

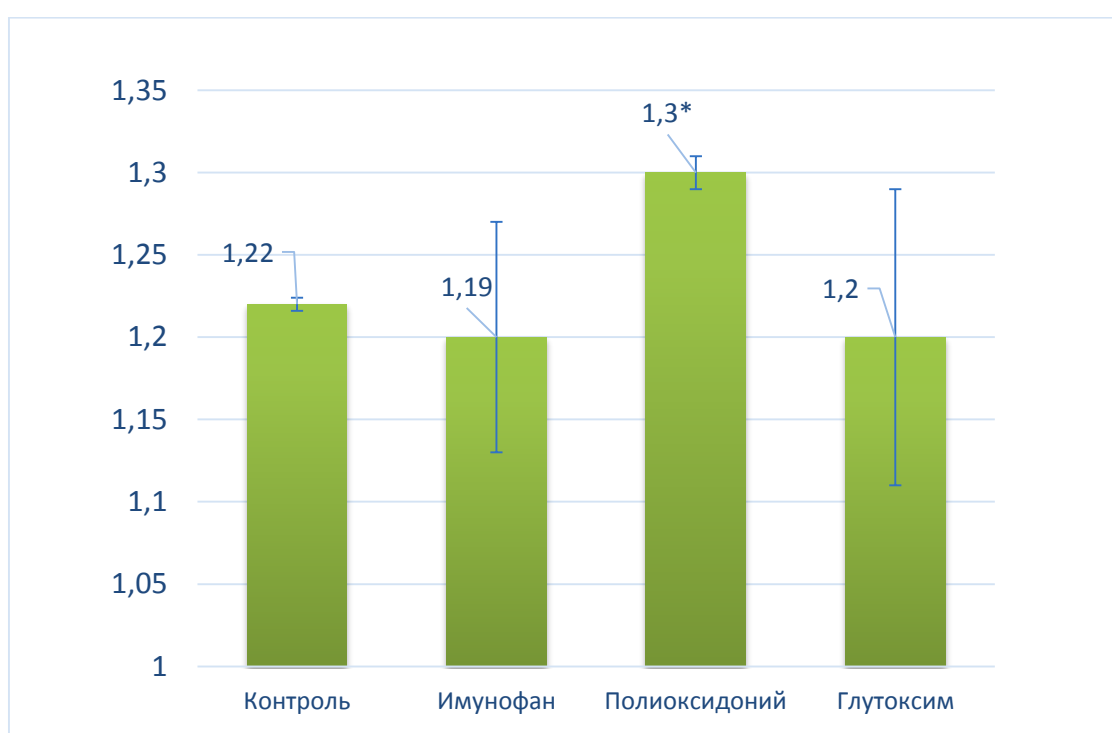


Рис. 7.1.2 Влияние иммунокорректоров с антиоксидантной активностью на индекс активации нейтрофилов для группы пациентов с исходными значениями ИС в пределах нормы.

В группе пациентов с изначально повышенной активностью нейтрофилов ($1,9\pm 0,1$, $n=48$) все исследуемые препараты оказывали не сравнимое друг с другом нормализующее действие. Имунофан снижал ИС по сравнению с его изначальным значение — без влияния препарата, на $30\pm 20\%$

до $1,3 \pm 0,3$, $p < 0,01$, Полиоксидоний – также на $30 \pm 20\%$ до $1,3 \pm 0,2$, ($p < 0,01$), Глутоксим – также на $30 \pm 20\%$ до $1,4 \pm 0,2$, ($p < 0,01$). (Рис.7.1.3.)



Рис. 7.1.3. Влияние иммунокорректоров с антиоксидантной активностью на индекс активации нейтрофилов для группы пациентов с изначальными значениями ИС в пределах нормы.

Таким образом, все выбранные нами иммуностропные препараты вызывают сравнимое друг с другом нормализующее влияние на изначально высокоактивные нейтрофилы, а также, умеренное повышение активности изначально низкоактивных нейтрофилов. При этом, имунофан в отличие от других исследованных препаратов вызывал снижение изначально нормальной активности нейтрофилов.

7.2. Влияние тимомиметиков на функциональную активность нейтрофилов

Для исследования были выбраны следующие препараты: тимоген, Тактивин. (Табл.7.2.1) Было проведено сравнительное исследование эффекта иммуностропных препаратов на кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов. Также, как и для препаратов из группы антиоксидантов, в связи с существенным разбросом исходных показателей, анализ проводился в группах исходно нормальных, сниженных и повышенных значений. (Табл.7.2.1.)

Таблица 7.2.1

Влияние тимомиметиков на показатели спонтанного НСТ-теста.

Группа	Препарат	n	сНСТ	
			Контроль	Препарат
Ниже нормы	Тимоген	128	46±2	57±3*
	Тактивин			56±4*
Норма	Тимоген	69	87±2	90±7
	Тактивин			88±7
Выше нормы	Тимоген	40	160±10	120±10*
	Тактивин			120±10*

*p<0,05

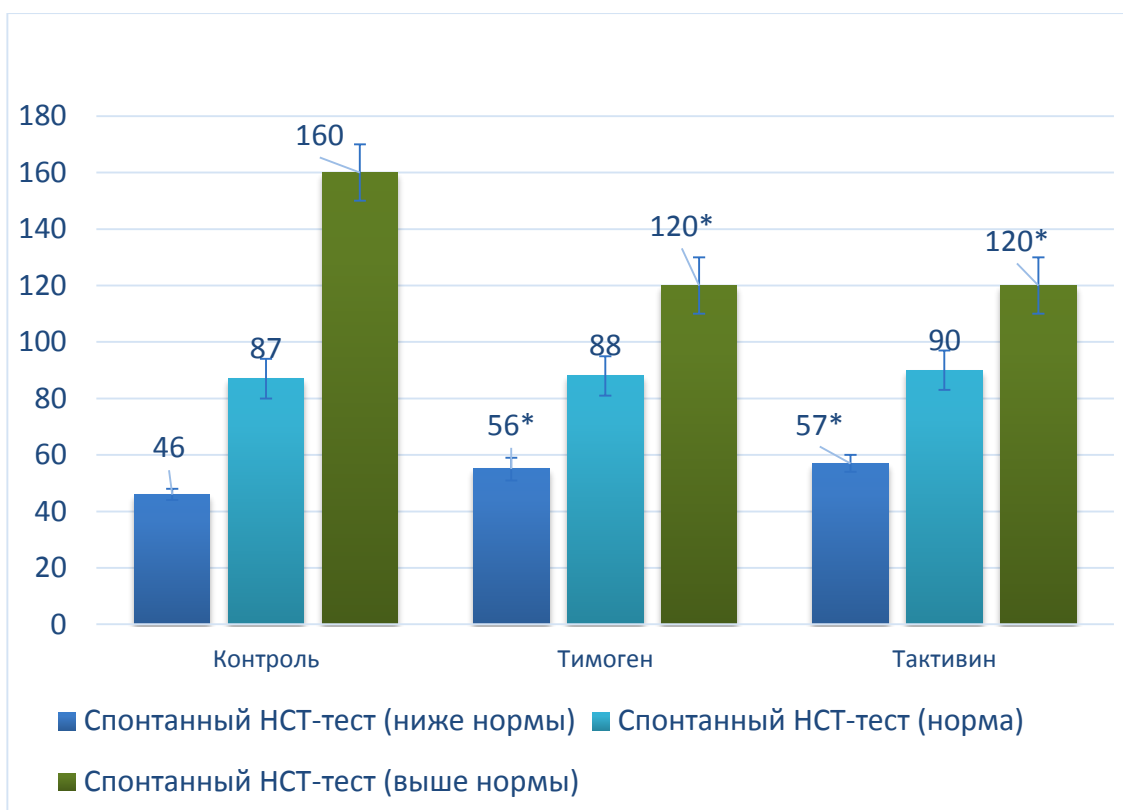


Рис. 7.2.1 Влияние тимоимитиков на показатели спонтанного сНСТ-теста.

Как видно из рисунка 7.2.1 при изначально пониженной активности нейтрофилов (46 ± 2 , $n=128$) оба препарата оказывали на неё сравнимое друг с другом действие, повышая показатели сНСТ. Тимоген повышал сНСТ на $24 \pm 6\%$ до 57 ± 3 , ($p < 0,05$), Тактивин - на $22 \pm 7\%$ до 56 ± 4 , ($p < 0,05$). При этом показатели сНСТ оставались ниже нормы.

Для пациентов с исходными значениями сНСТ в пределах нормы (87 ± 2 , $n=69$) ни один из препаратов рассматриваемой группы не оказывал достоверного влияния.

При этом в группе пациентов с изначально повышенной активностью нейтрофилов (160 ± 10 , $n=40$) оба препарата оказывали одинаковое, нормализующее действие понижая сНСТ на $30 \pm 10\%$. Тимоген понижал сНСТ

до 120 ± 10 , ($p < 0,05$) также, как и Тактивин 120 ± 10 , ($p < 0,05$) и показатели сНСТ приходили к верхней границе нормы.

Таблица 7.2.2

Влияние тимомиметиков на показатели индуцированного НСТ-теста.

Группа	Препарат	n	Контроль	Препарат
			иНСТ	
Ниже нормы	Тимоген	168	56±3	64±3*
	Тактивин			68±4*
Норма	Тимоген	35	133±5	117±9
	Тактивин			120±10
Выше нормы	Тимоген	12	230±30	150±40*
	Тактивин			200±50

* $p < 0,05$

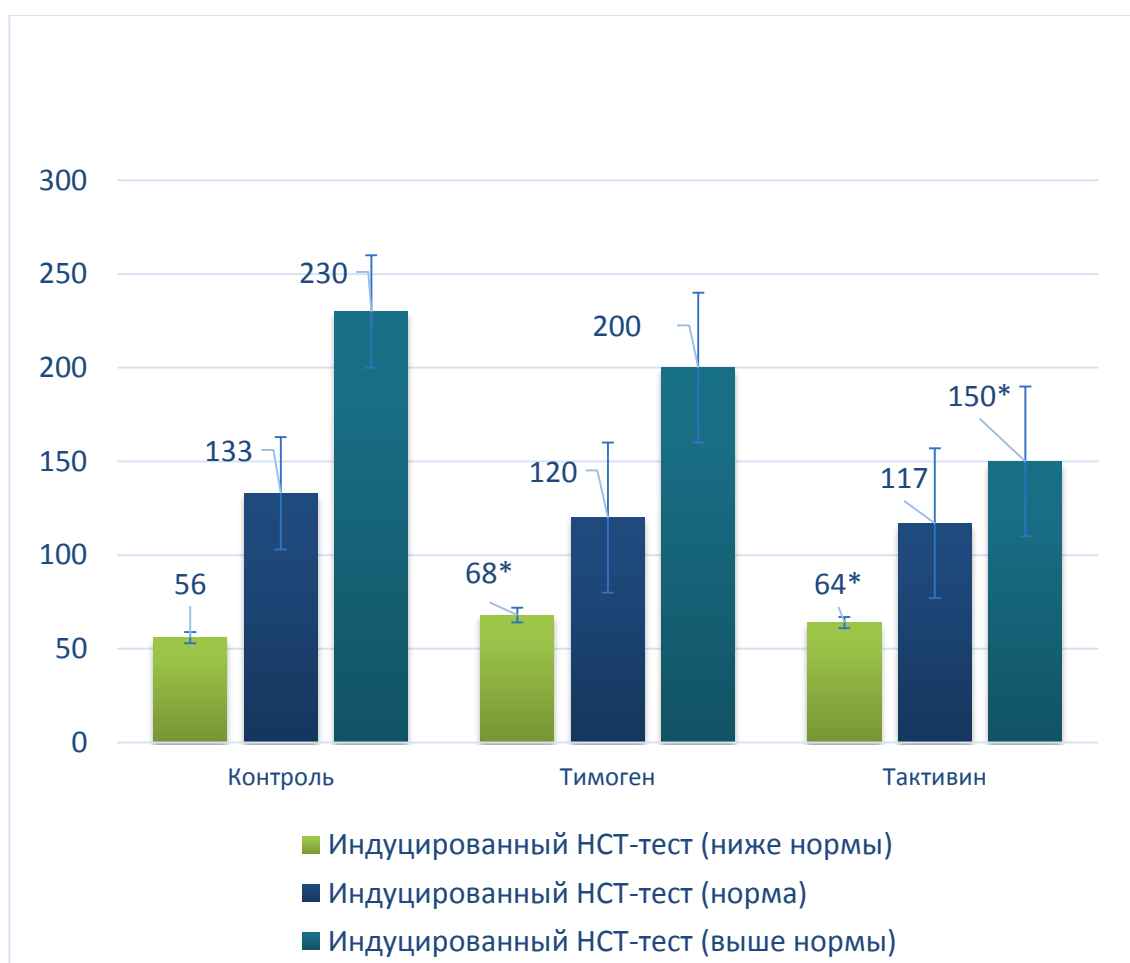


Рис. 7.2.2 Влияние тимомиметиков на показатели индуцированного НСТ-теста.

При изучении влияния тимомиметиков на показатели индуцированного НСТ-теста обращает внимание (Табл. 7.2.2), что при изначально пониженной активности нейтрофилов (56 ± 3 , $n=168$) также, как и для сНСТ, оба препарата оказывали сопоставимое повышающее действие: Тимоген повышал иНСТ на $14 \pm 6\%$ до 64 ± 3 , ($p < 0,05$), Тактивин - на $21 \pm 7\%$ до 68 ± 4 , ($p < 0,05$) и, как и при рассмотрении влияния препаратов данной группы на сНСТ, изначально пониженные показатели иНСТ оставались ниже нормы.

Для пациентов с исходными значениями иНСТ в пределах нормы (133 ± 5 , $n=35$) оба препарата существенного влияния на иНСТ не оказывали. В группе пациентов с изначально повышенной активностью нейтрофилов (230 ± 30 , $n=12$) только Тимоген оказывал нормализующее влияние на иНСТ понижая его на $40 \pm 50\%$ 150 ± 40 , ($p < 0,05$).

Таблица 7.2.3

Влияние тимомиметиков на ИС

Группа	Препарат	n	Контроль	Препарат
			ИС	
Ниже нормы	Тимоген	194	0,79±0,02	1,05±0,06*
	Тактивин			1,05±0,07*
Норма	Тимоген	69	1,22±0,02	1,14±0,07
	Тактивин			1,19±0,09
Выше нормы	Тимоген	50	1,8±0,1	1,3±0,1*
	Тактивин			1,3±0,1*

* $p < 0,01$

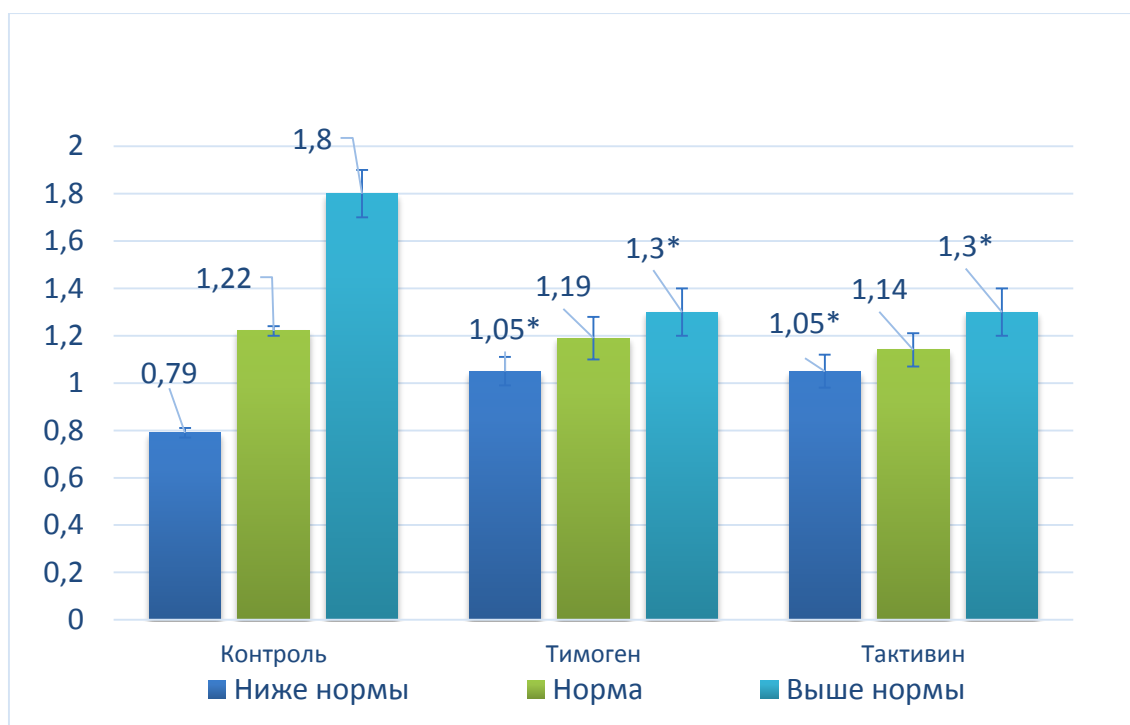


Рис. 7.2.3 Влияние тимомиметиков на ИС.

В группе пациентов с ИС изначально ниже нормы ($0,79 \pm 0,02$, $n=194$) оба препарата оказывали одинаковое нормализующее действие повышая ИС на $33 \pm 5\%$. Тимоген повышал ИС до $1,05 \pm 0,06$, ($p < 0,01$), Тактивин – на до $1,05 \pm 0,07$, ($p < 0,01$). Для пациентов с изначально нормальными значениями ИС ($1,22 \pm 0,02$, $n=69$) существенных изменений не отмечено.

В группе пациентов с изначально повышенной активностью нейтрофилов ($1,8 \pm 0,1$, $n=50$) оба препарата оказывали одинаковое нормализующее действие, приводя ИС к нормальным значениям $1,3 \pm 0,1$, ($p < 0,01$), понижая на $30 \pm 10\%$.

Таким образом, оба выбранные нами иммуностропных препарата данной группы оказывали сравнимое друг с другом нормализующее влияние на изначально высокоактивные нейтрофилы (за исключением действия Тактивина на иНСТ), а также, умеренное повышение активности изначально

низкоактивных нейтрофилов. При этом, оба препарата вызывали небольшое снижение изначально нормальных показателей ИНСТ, что демонстрирует важность предварительной индивидуальной *in vitro* диагностики при назначении терапии иммунокорректорами.

7.3. Влияние интерферонов и индукторов интерферонов на функциональную активность нейтрофилов

Сравнивалось действие Интрона-А и Циклоферона на показатели НСТ-теста. Было проведено сравнительное исследование эффекта иммуностропных препаратов на кислородзависимую бактерицидность нейтрофилов. Также, как и для других групп препаратов, в связи с существенным разбросом показателей теста, при изучении действия выбранной пары препаратов анализировалась динамика показателей в трёх группах: с исходно сниженными, нормальными и повышенными значениями.

Таблица 7.3.1

Влияние интерферонов и индукторов интерферонов на показатели спонтанного НСТ-теста.

Группа	Препарат	n	Контроль	Препарат
			сНСТ	
Ниже нормы	Инtron-А	212	42±2	50±3*
	Циклоферон			48±3
Норма	Инtron-А	82	87±4	76±6
	Циклоферон			76±5
Выше нормы	Инtron-А	24	150±20	120±20
	Циклоферон			130±30

*p <0,05

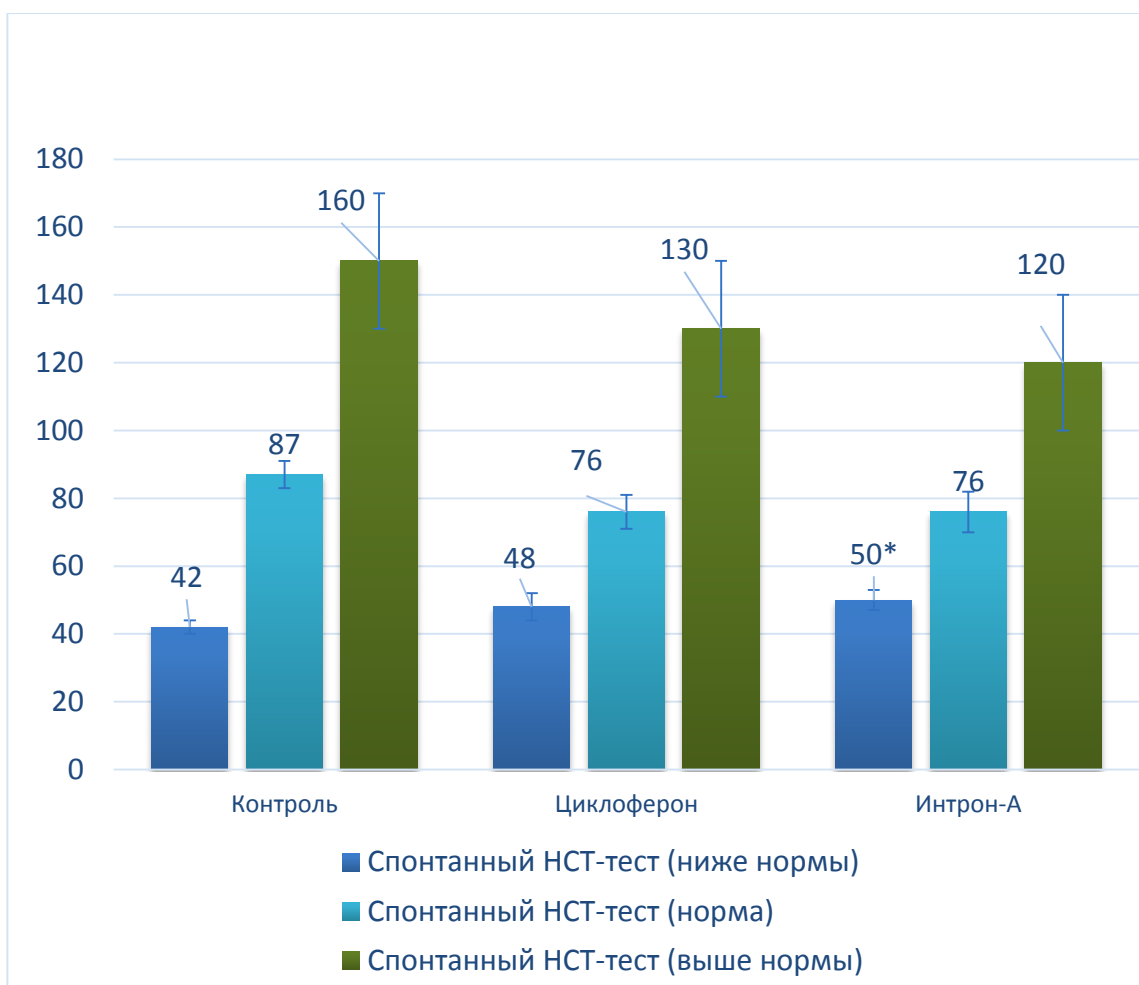


Рис. 7.3.1 Влияние интерферонов и индукторов интерферонов на сНСТ.

В группе пациентов с изначально пониженной активностью нейтрофилов (42 ± 2 , $n=212$) только Интерн-А достоверно повышал сНСТ на $19 \pm 6\%$ до 50 ± 3 , ($p < 0,01$).

Для пациентов с контрольными значениями сНСТ в пределах нормы (87 ± 4 , $n=82$) оба препарата не достоверного оказывали влияния на сНСТ.

В группе пациентов с изначально повышенной активностью нейтрофилов (160 ± 10 , $n=40$) оба препарата также не вызывали достоверного изменения сНСТ. (Табл. 7.3.2)

Таблица 7.3.2

Влияние интерферонов и индукторов интерферонов на показатели индуцированного НСТ-теста.

Группа	Препарат	n	Контроль	Препарат
			иНСТ	
Ниже нормы	Инtron-A	324	54±2	60±2*
	Циклоферон			58±3
Норма	Инtron-A	22	140±20	130±20
	Циклоферон			120±20

*p < 0,05

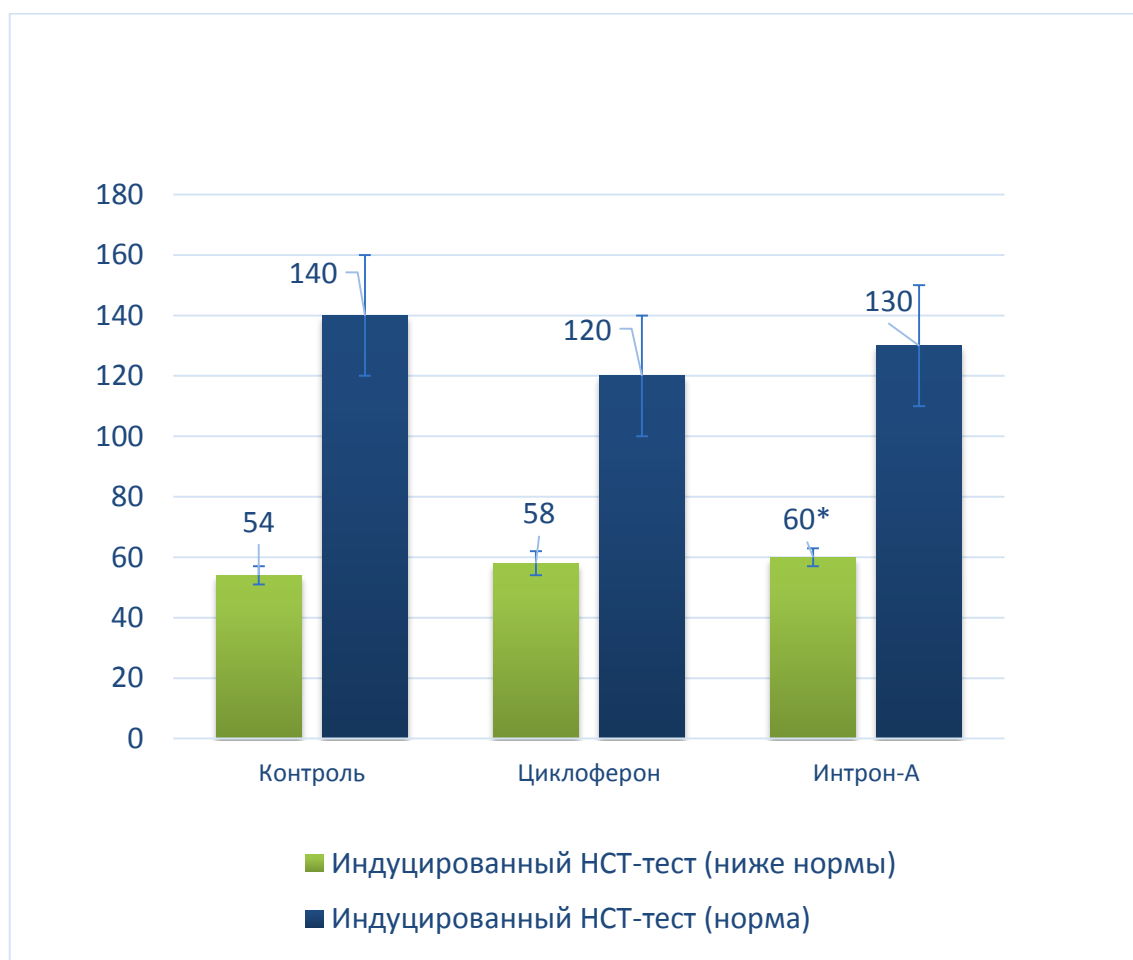


Рис. 7.3.2 Влияние интерферонов и индукторов интерферонов иНСТ.

В группе пациентов с изначально пониженной активностью нейтрофилов (54 ± 2 , $n=324$) также, только Интрон-А незначительно повышал иНСТ по сравнению с контролем до $11 \pm 5\%$ 60 ± 2 , ($p < 0,05$).

Таблица 7.3.3

Влияние интерферонов и индукторов интерферонов на ИС

Группа	Препарат	n	Контроль	Препарат
			ИС	
Ниже нормы	Интрон-А	241	0,80±0,02	1,11±0,07*
	Циклоферон			1,06±0,07*
Норма	Интрон-А	90	1,22±0,02	1,3±0,1
	Циклоферон			1,20±0,09
Выше нормы	Интрон-А	69	1,9±0,1	1,2±0,1*
	Циклоферон			1,3±0,1*

* $p < 0,01$

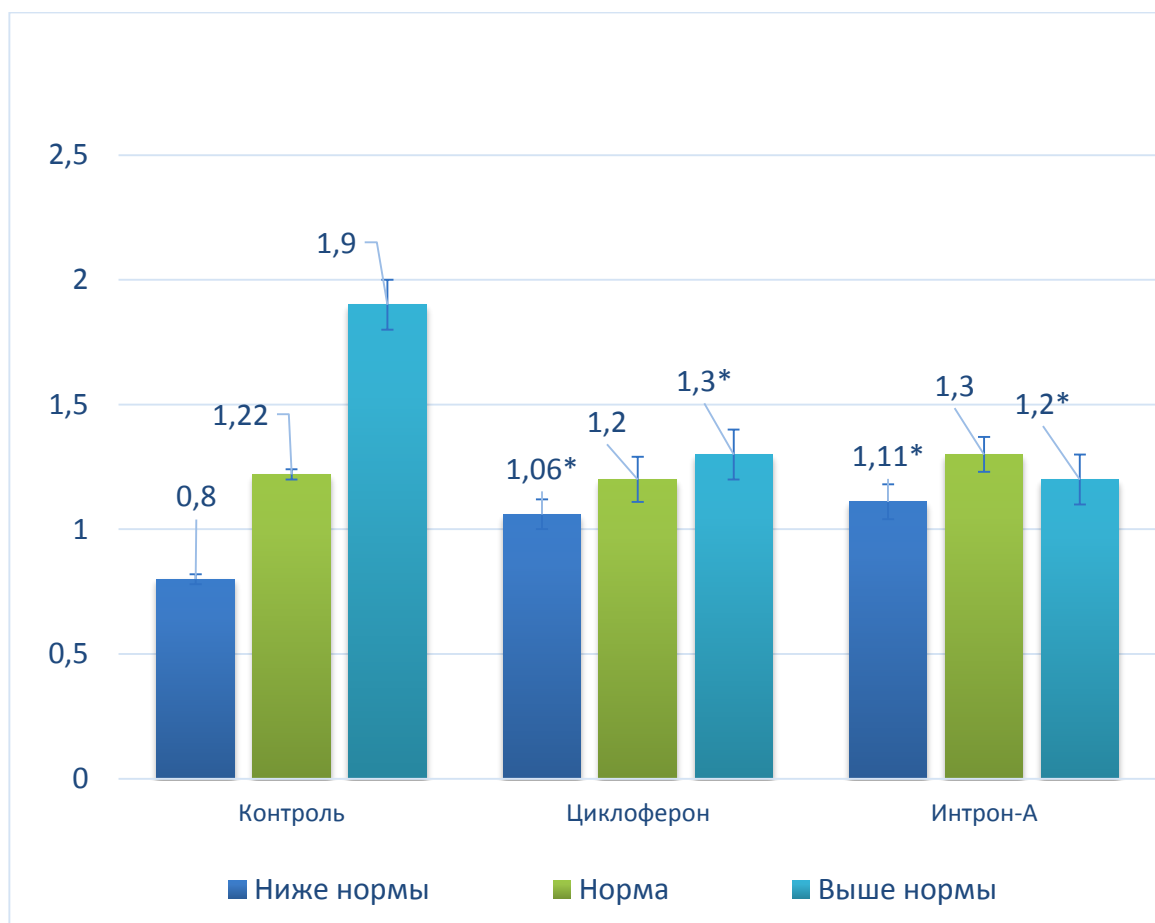


Рис. 7.3.3 Влияние интерферонов и индукторов интерферонов на ИС.

В группе пациентов с ИС изначально ниже нормы ($0,80 \pm 0,02$, $n=241$) оба препарата оказывали сравнимое друг с другом действие, повышая ИС и приводя его в норму. Интрон-А повышал ИС на $39 \pm 5\%$ до $1,11 \pm 0,07$, ($p < 0,01$), Циклоферон — на $31 \pm 5\%$ до $1,05 \pm 0,07$, ($p < 0,01$).

Для пациентов с исходными значениями ИС в пределах нормы ($1,22 \pm 0,02$, $n=90$) ни один из препаратов существенно не влиял на активность нейтрофилов, ИС оставался в пределах нормы.

В группе пациентов с ИС изначально выше нормы ($1,9 \pm 0,1$, $n=69$) оба препарата оказывали сравнимое действие, понижая ИС и приводя его в норму. Интрон-А понижал ИС на $40 \pm 10\%$ до $1,2 \pm 0,1$, ($p < 0,01$), Циклоферон — на $30 \pm 10\%$ до $1,3 \pm 0,1$, ($p < 0,01$).

Таким образом, все выбранные нами иммуотропные препараты вызывают сравнимое друг с другом нормализующее влияние на изначально высокоактивные нейтрофилы, а также, умеренное повышение активности исходно низкоактивных нейтрофилов. При этом, имунофан, Интрон-А и Циклоферон в отличии от других исследованных препаратов вызывали небольшое снижение исходно нормальной активности нейтрофилов, что демонстрирует важность предварительной индивидуальной *in vitro* диагностики при терапии иммунокорректорами.

Необходимость индивидуального подбора терапии *in vitro* была подтверждена и сопоставлением конкретных полученных результатов с

клиническими данными. Подобранные таким образом препараты существенно повышали эффективность лечения.

Кроме того, при индивидуальном анализе получаемых результатов во многих случаях был отмечен разнонаправленный ответ спонтанного и индуцированного НСТ-теста. При этом в подавляющем большинстве случаев ИС больше соответствовал клиническим признакам, что позволило рекомендовать именно этот показатель как критерий выбора.

8. ВЫВОДЫ

1. НСТ-тест позволяет оценивать иммуностропную эффективность фармакологических препаратов, обладающих различными механизмами воздействия на патофизиологический процесс.
2. Выявленная в ходе проведенной работы индивидуальность иммунного ответа пациентов на различные иммуностропные препараты убедительно доказывает необходимость подбора препаратов *in vitro*.
3. Полученные в ходе исследования данные свидетельствуют, что рассмотренные препараты, относящиеся к различным фармакологическим группам, оказывают преимущественно нормализующее воздействие на показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста, индекс активации.
4. При проведении исследований эффективности иммуностропной терапии оценку результатов необходимо проводить дифференцированно в группах с исходно повышенными, сниженными и нормальными показателями.
5. Для подбора лечебных дозировок и определения индивидуальной чувствительности более предпочтительно ориентироваться на коэффициент активации нейтрофилов, чем на показатели спонтанного и индуцированного НСТ-теста.

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.

1. Любошенко Т.М. Изучение распространённости вторичных иммунодефицитов среди населения РФ с помощью кластерного анализа // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – N 3; URL: www.science-education.ru/117-13821 (дата обращения: 18.04.2015).
2. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.
3. Российский статистический ежегодник. М.: Росстат, 2014. – 693 с.
4. Гевондян Н.М., Алехин А.И., Гевондян В.С.// Новая форма вторичной иммунологической недостаточности и ее роль в развитии патологии. Аллергология и иммунология. – 2014(15). – N 3. С. 199.
5. Винницкий Л. И.// Проблемы клинического применения иммунокорректоров в хирургической клинике. Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – N 12. С. 12-16.
6. Лусс Л.В.// Качество жизни. Медицина. – 2005. – N 4. – С. 73-76.
7. Гусакова Н.В., Новикова И.А. Функциональная активность нейтрофилов при хронической рецидивирующей герпетической инфекции // Медицинская иммунология. – 2013. – № 2. – С. 169-176.
8. Рагулина В.А., Локтионов А.Л., Конопля А.И., Покровский М.В., Алехин С.А., Покровская Т.Г., Гудырев О.С., Корокин М.В., Кочкаров В.И. Эффективность производных 3-гидроксипиридина в коррекции иммунных и оксидантных нарушений при экспериментальном остром панкреатите // Научные ведомости. – 2012. – № 4. – С. 203-207.

9. Кратнов А.Е. Активность глутатионредуктазы в нейтрофилах – важный маркер окислительного стресса при ишемической болезни сердца // Российский иммунологический журнал. – 2011. – № 1. – С. 45-49.
10. Курзанов А.Н., Славинский А.А., Титов М.И., Балачевский Б.В. Влияние активации опиатных рецепторов нейтрофильных лейкоцитов на их функционально-метаболическую активность // Медицинская Иммунология. – 2007. – № 3. С. 148 -149.
11. Afzal MM, Jeshtadi A, Mohmmed AK. Study of neutrophilic function by nitroblue tetrazolium test in septicemias and immune deficiency diseases. Int J Res Health Sci. 2014 Apr 30; 2(2):581-90.
12. Hyung Sim Choi , Jun Woo Kim , Young-Nam Cha & Chaekyun Kim (2006) A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells, Journal of Immunoassay and Immunochemistry, 27:1, 31-44, Published online: 06 Feb 2007.
13. Amarasekara D. S., Wijerathna S., Fernando C., Udagama P. V., Cost-effective diagnosis of male oxidative stress using the nitroblue tetrazolium test: useful application for the developing world Andrologia, 2014, 46, 73–79.
14. Dubaniewicz A., Dubaniewicz A., Hoppe A. The spontaneous and stimulated nitroblue tetrazolium (NBT) tests in mononuclear cells of patients

- with tuberculosis, *Annales Academiae Medicae Bialostocensis* 2004(49), 252-255.
15. Горностаева Ю. А. Вторичные иммунодефицитные состояния у взрослых в общеклинической практике // *Аллергология*. – 2010. – № 2 (53). – С. 13-15.
16. Ерофеев Ю. В. Особенности формирования здоровья населения крупного промышленного центра Западной Сибири / Ю. В. Ерофеев, В. А. Ляпин, Т. А. Нескин // *Сибирь-Восток*. – 2005. – № 9. – С. 4-8.
17. Порядин Г.В. Молекулярные и клеточные механизмы иммунопатологии (состояние и перспективы развития исследований). Актовая речь. – М.: РГМУ, 2008. – 48 с.
18. Куликова О.М. Прогнозирование онкологических заболеваний на территории РФ / О.М. Куликова, Т.М. Любошенко, А.А. Фоменко // *Современные проблемы науки и образования*. – 2012. – № 3. URL: <http://www.science-education.ru/103-6173> (дата обращения: 10.04.2015)
19. Горностаева Ю. А. Вторичные иммунодефицитные состояния у взрослых в общеклинической практике // *Аллергология*. – 2010. – № 2 (53). – С. 13-15.
20. Малашенкова И.К., Дидковский Н.А., Левко А.А. К вопросу о роли индивидуального подбора иммунокорректоров. *Фарматека*. – 2004. – С. 118-122.

- 21.Кратнов А. Е. Роль нейтрофилов в патогенезе ишемической болезни сердца // Научно-практический журнал «Клинико-лабораторный консилиум». – 2013. – № 2-3(46) – С. 39-44.
- 22.Сергеева И.В., Камзалакова Н. И., Тихонова Е.П., Булыгин Г.В. Патогенез острых респираторных вирусных инфекций и гриппа // Практическая медицина. – 2012. - № 6. – С. 47-50.
- 23.Малашенкова И.К., Дидковский Н.А. Принципы иммунокорригирующей терапии вторичных иммунодефицитов, ассоциированных с хронической вирусно-бактериальной инфекцией// РМЖ.- 2002.- Т.10.- №21.- С. 973–977.
- 24.Петров Р.В., Хайтов Р. М., Некрасов А.В., Аттаулаханов Р.И., Пучкова Н.Г., Иванова А.С., Пинегин Б.В., Хаумидуллина К.Ф., Дамбаева С.В., Климова С.В. Полиоксидоний: механизм действия и клиническое применение // Медицинская иммунология. – 2000. – № 3. – С. 271-278.
- 25.Лебедев В.В. Имунофан (Разработка, клинико-экспериментальное изучение и внедрение в практику): дис. ... канд./д-ра мед. наук. ЦНИИ Эпидемиологии Минздрава РФ, Москва, 1997.
- 26.Анисимова Т. М., Высокогорский В. Е. Влияние препарата глутоксим на процессы свободно радикального окисления и состояние системы глутатиона при комплексной терапии одонтогенных флегмон // Медицинская наука и образование Урала. – 2010. – № 2. – С. 85-87.

- 27.Алешина Г.М., Янкелевич И.А., Кокряков В.Н. Особенности дегрануляции нейтрофильных гранулоцитов под действием различных стимуляторов // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – 504 с.
- 28.Клиническая фармакология тимогена / под ред. В.С. Смирнова. - СПб.: ФАРМиндекс, 2004. - 172 с.
- 29.Теоретические и клинические аспекты биорегулирующей терапии в хирургии и травматологии / Б.И. Кузник, И.Д. Лиханов, В.Л. Цепелев, В.А. Сизоненко. - Новосибирск: Наука, 2008. - 311 с.
- 30.Арион В.Я., Зимина И.В., Москвина С.Н., Быстрова О.В. Тактивин - природный иммунокорректор. клиническое применение // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2007. - № 4. С. 11-26.
31. Киселева Н.М., Новоселецкая А.В., Иноземцев А.Н. Иммуномодулятор тактивин: новый спектр действия // Электронный научно-образовательный вестник Здоровье и образование в XXI веке. - 2010. - № 4. - С. 194-195.
- 32.Малашенкова И.К., Дидковский Н.А., Левко А.А. К вопросу о значении индивидуального подбора иммунокорректоров // Фарматека. - 2007. - № 12. - С. 4.
- 33.Conde M, Andrade J, Bedoya FJ, Sobrino F. Inhibitory effect of interferon-alpha on respiratory burst and glucose metabolism in phagocytic cells. J Interferon Res. 1994 Feb;14(1):11-6.

34. Колтаков И. А., Шилов С. В., Леликова Е. Н., Артюхов В. Г., Уровень экспессии CD14 антигенов нейтрофилами крови человека в условиях комбинированного воздействия УФ-излучения и $\alpha 2b$ -интерферона // Вестник ВГУ, Серия: химия. биология. Фармация. – 2013. – № 2. С. 106 -109.
35. Дидковский Н. А., Наровлянский А. Н., Коваленко А. Л. и др. Коррекция циклофероном иммунодефицитного состояния // Циклоферон -от эксперимента в клинику. Применение лекарственных форм циклоферона. – СПб., 2002. – С. 20-39.
36. Бажанова Е.Д. Циклоферон: механизм действия, функции и применение в клинике // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – № 7. – С. 40-44.
37. Мельникова Я.И., Зуенок Н.Н., Изучение влияния перекисных условий на функциональную активность нейтрофилов периферической крови человека // Материалы XVI Международной научной конференции (Сахаровские чтения): «Экологические проблемы XXI века» Минск 2011.
38. Регистр лекарственных средств России; URL: <http://www.rlsnet.ru> (дата обращения: 20.05.2015).
39. Экологическая иммунология / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов. – Москва: Изд-во ВНИРО, 1995. – 219 с.