УДК 616.322-002.2:576.858:616-023/-098.001.8

О.Ф. МЕЛЬНИКОВ[1], Д.І. ЗАБОЛОТНИЙ[1], М.Д. ТИМЧЕНКО[1], І.В. ФАРАОН[1], М.Б. САМБУР[1], О.Д. ТУПІЦЬКА[1], О.Г. РИЛЬСЬКА[1], О.Ю. БРЕДУН[2], Т.В. СИДОРЕНКО[1], В.О. КОТОВ[1]

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПРЕБІОТИКІВ НА ВМІСТ АНТИТІЛ ДО ВІРУСІВ ТА МІКРОБІВ РЕСПІРАТОРНОЇ ГРУПИ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ПІДНЕБІННИХ МИГДАЛИКІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ТОНЗИЛІТ В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VITRO

[1]Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України»
(дир. – акад. НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)
[2]Національний університет охорони здоров'я імені П.Л. Шупика МОЗ України
(ректор – акад. НАМН України, проф. В.В. Камінський)

В останні десятиріччя інтенсивно досліджуються активність та точки впливу пребіотиків, мікроелементних сполук та вітамінів, які відіграють суттєву роль кофакторів в підтриманні системи імунітету як локального так і системного, специфічного та вродженого на рівні стабільного гомеостазу. Дотепер залишається багато питань з приводу доцільності використання пребіотиків в плані імуномодулюючих препаратів при лікуванні хворих на хронічні захворювання в тому числі і верхніх дихальних шляхів та з метою застосування при вакцинопрофілактиці проти вірусів респіраторної групи [1, 3, 5, 12]. Ці пропозиції відповідають рекомендаціям EPOS 2020 [12], де пропонується проводити дослідження із визначення ролі вакцин, вітамінів та інших фармпрепаратів в обґрунтуванні та оцінці ефективності лікування хворих на вірусні захворювання слизової оболонки верхніх дихальних шляхів та при вакцинопрофілактиці.

Тому ***метою*** досліджень було визначити вплив пребіотиків на продукцію анамнестичних антитіл до вірусів та мікробів респіраторної групи клітинами піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт в експерименті in vitro.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на культурах клітин мигдаликів, отриманих від 20 хворих на хронічний тонзиліт, яким за показаннями проводилась тонзилектомія. Вік обстежених – від 16 до 40 років, з них 14 були жіночої статі. Подальша робота з обробки тканин виконувалась за рекомендаціями І. Кайдашева і співавторів (2003) та О.Ф. Мельникова та співавторів (2017) [6, 8].

Тканина мигдаликів заливалась середовищем 199 («Serva», Німеччина) з гентаміцином («Дарниця», Україна) в концентрації 120 мкг/мл та залишалась при температурі 4-8^0 С на 20 хв. Після цього видалялись геморагічні частини з цілого мигдалика, які переносились в середовище Ігла (Sigma, USA) і промивались полосканням в ньому 3-4 рази, потім вносились до стерильних флаконів зі збагаченим середовищем Ігла (+ глутамін, бікарбонат, 100-кратний концентрат вітамінів, ембріональна сироватка теляти – 5 %, 60 мкг/мл гентаміцину). Тканина розрізалась ножицями і промивалась середовищем з вимиванням клітин, після цього фільтрувалась крізь нейлоновий фільтр. Усі маніпуляції проводились в ламінарній шафі ЕС160 (Туреччина) в потоці стерильного

повітря. Підраховувалась кількість клітин за допомогою світлового мікроскопу (Olympus-23, Японія) та камери Горяєва. Клітинна завись готувалась із розрахунку $2,5x10^6$ лімфоцитів у 1 мл середовища. Відсоток нежиттєздатних клітин підраховувався при забарвлені вихідної суспензії розчином трипанового синього. При вмісті мертвих клітин >10 % матеріал в роботі не використовувався.

В дослідні зразки перед культивуванням додавались різні пребіотичні препарати. До культури клітин мигдаликів до кожного зразка окремо додавали вітамін С («Дарниця», Україна) в дозі 50 мкг, D_3 («Аквадетрим») – 25 одиниць («Medana», Польща), розчин цинку медичного в дозі 50 мкг. В контрольні проби до клітин додавали 2 мкг білку нормальної сироватки людини. Клітини в контрольних та дослідних разках культивувались при 37^0С протягом 24 год. Після 24-годинного культивування отримували супернатанти, в яких визначали антитіла до респіраторних вірусів: грипу А і В – реакцією гальмування гемаглютинації еритроцитів групи АВ, (згідно рекомендацій С.В. Зайкова [4], до N- і S-антигенів вірусу SARS-CoV-2 (ТОВ «Діапроф», Україна), до капсидного антигену *Virus Epstein-Barr* (VEB) («Euroimmun» (Німеччина)), до *Human orthopneumovirus* («Diagnostic Nord» (Німеччина)), до вірусу *Herpes simplex* 1-го типу (HSV-1) методом імунофлюорисцентного аналізу, до стрептолізину-О *Streptococcus pyogenes* – АСЛ-О («Гранум», Україна) латексним методом, до протеогліканів *Klebsiella pneumoniae* («Biostim», Франція) реакцією непрямої гемаглютинації за Boyden [13].

Статистична обробка отриманих результатів проводилась із застосуванням однобічного непараметричного критерію «U» Манна-Уітні, а при аналізі $\log_2$ титрів АТ використовувався параметричний метод t-Стьюдента. Відмінності вважались статистично достовірними при $p<0,05$. Розрахунки проводились за допомогою пакетів програм відкритого доступу WIN PEPI та Біостат, дотримуючись наведених у літературі рекомендацій [2].

Результати

Отримані дані свідчать про те, що піднебінні мигдалики мають варіабельний потенціал щодо продукції анамнестичних антитіл, більше виражений по відношенню до антигенів грипу і *Streptococcus pyogenes*, тоді як анамнестичної гуморальної реакції по відношенню до VEB та антигенів вірусу SARS-CoV-2 визначено не було.

Показано, що вітаміни С, D_3 та препарат цинку при додаванні їх in vitro ефективно стимулюють продукцію антитіл проти вірусів грипу клітинами піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт (табл. 1).

Таблиця 1

Вміст антитіл до гемаглютинінів вірусів грипу у супернатантах клітин мигдаликів після інкубації з препаратами in vitro

Препарати	n	$\log_2$ титрів антитіл	
		M±m	Достовірність розбіжностей з контролем, p
Контроль	21	0,45±0,17	-
Вітамін С	20	2,13±0,29	<0,01
Вітамін D_3	20	2,17±0,28	<0,01
Zn	20	2,50±0,27	<0,01

Результати визначення рівнів антитіл до N- та S-антигенів вірусу SARS-CoV-2 в культуральному середовищі після культивації клітин мигдаликів з пребіотиками, репрезентовані в табл. 2, свідчать про те, що тільки аквадетрім стимулював збільшення в

культуральній рідині імуноглобулінів проти білків коронавірусу.

При визначені концентрації антитіл до капсидного антигену VEB вірусу Епштейн-Барр не було виявлено суттєвих відхилень за умов додавання в культуральне середовище усіх досліджених пребіотиків від вмісту цих антитіл у контролі (рис. 1.).

В табл. 3 представлено дані щодо вмісту антитіл до *Human orthopneumovirus* в культуральній рідині після культивації клітин мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт з препаратами різних груп. З наведених в таблиці даних випливає, що тільки препарат цинку чинить суттєвий вплив на рівень антитіл до *Human orthopneumovirus*, збільшуючи його майже в 8 разів!

Дослідженням вмісту антитіл до вірусу *HSV-1* встановлено, що рівень антитіл до цього вірусу в супернатантах достовірно збільшувався при дії на клітини мигдаликів аквадетриму ($p<0,05$) і мав характер тенденції до збільшення під впливом препарату цинку ($p<0,07$) (табл. 4).

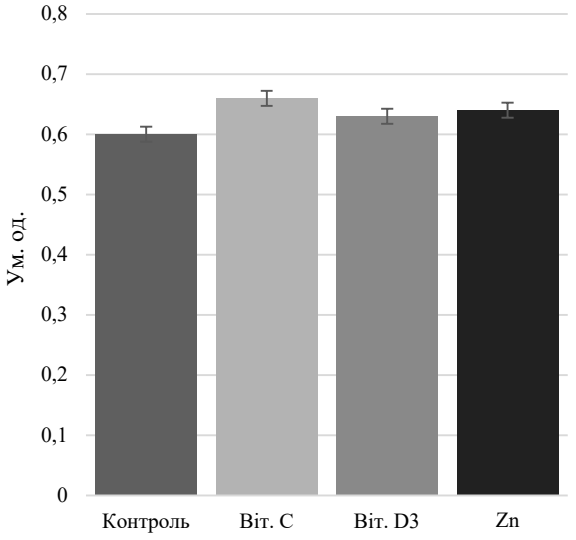

Рис. 1. Вміст антитіл до капсидного антигену Епштейн-Барр вірусу в культуральному середовищі (індекс позитивності, у.о.).

Таблиця 2

Вміст антитіл класу G до антигенів вірусу SARS-CoV-2 в супернатантах клітин мигдаликів після інкубації з препаратами in vitro

Препарати	Вміст антитіл, г/л			
	n	середнє значення	межі коливань	P
Контроль	21	0,15	0,10-0,18	--
Вітамін С	20	0,19	0,12-0,20	>0,05
D_3	20	0,25	0,12-0,26	<0,05
Zn	20	0,20	0,12-0,22	<0,07

Таблиця 3

Вплив пребіотиків на вміст антитіл до *Human orthopneumovirus* в культуральному середовищі після інкубації клітин піднебінних мигдаликів з препаратами in vitro

Препарати	Вміст антитіл, МО/мл			
	n	середнє значення	межі коливань	P
Контроль	21	0,45	0,10-0,85	-
Вітамін С	20	0,50	0,1-1,0	>0,05
D_3	20	0,45	0,10-1,2	>0,05
Zn	20	2,82	0,12-20,0	<0,001

Таблиця 4

Вплив пребіотиків на вміст антитіл до *HSV-1* в культуральному середовищі після інкубації клітин піднебінних мигдаликів з препаратами in vitro

Препарати	Вміст антитіл, RU/мл			
	n	середнє зачення	межі коливань	P
Контроль	21	3,64	0,0-16,85	--
Вітамін С	20	5,15	0,5-17,5	>0,05
D_3	20	4,95	0,7-15,6	>0,05
Zn	20	5,60	2,35-15,6	<0,05

Наступним кроком досліджень було визначення впливу пребіотиків на вихід в культуральну рідину антитіл проти мікробів респіраторної групи, а саме – проти стрептолізину-О *Streptococcus pyogenes* – антистрептолізину-О (АСЛ-О) та проти поверхневих протеогліканів *Klebsiella pneumoniae*.

Дані щодо впливу пребіотиків на вміст АСЛ-О в супернатантах, викладені в табл. 5, свідчать про те, що всі застосовані пребіотики з високим рівнем достовірності збільшували вихід з клітин мигдаликів в культуральну рідину антитіл типу АСЛ-О. Суттєвого впливу всіх досліджених пребіотиків на рівень антитіл до поверхневих протеогліканів *Klebsiella pneumoniae* після їх інкубації з клітинами піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт визначено не було (рис. 2).

Таблиця 5

Вміст антитіл до антигену *Streptococcus pyogenes* – АСЛ-О в супернатантах клітин мигдаликів після інкубації з препаратами in vitro

Препарати	n	Титр АСЛ-О, log_2	
		M±m	достовірність розбіжностей з контролем, p
Контроль	21	1,33±0,10	-
Вітамін С	20	3,21±0,52	<0,02
Вітамін D_3	20	2,85±0,38	<0,05
Zn	20	3,50±0,27	<0,02

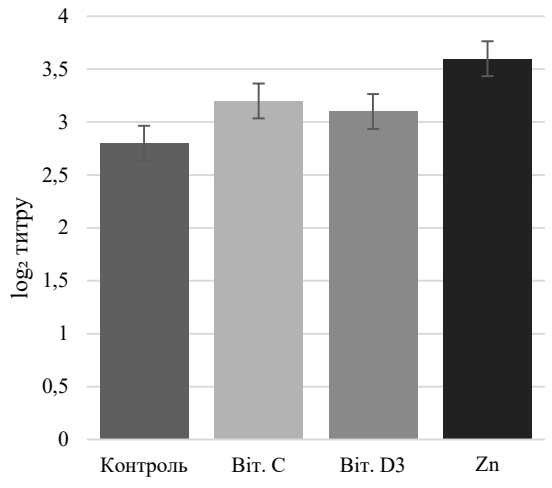

Рис. 2. Вміст антитіл до протеогліканів *Klebsiella pneumoniae* в супернатантах після дії різних пребіотиків.

Таким чином, отримані дані щодо активності продукції клітинами мигдаликів антитіл до вірусів і мікробів респіраторної групи вказують на те, що найбільш значущі результати визначено по відношенню до антигенів вірусу грипу А і В та *S. pyogenes*.

Обговорення

Встановлено, що на всі застосовані препарати не виявлено суттєвих реакцій з боку клітин мигдаликів за продукцією антитіл до антигенів вірусу *SARS-CoV-2*, за виключенням аквадетриму та VEB. Гемаглютиніни вірусу грипу в 19% досліджень виявлялист в значущих титрах (1:16 і більше), при дії препаратів цинку і вітаміну D_3 – в 30% супернатантів. Серед дослідних зразків

досліджених культур тонзилоцитів АСЛ-О активно продукувався в 35% зразків під дією вітаміну С, в 25% – D_3, в 50% – цинку. Можна припустити, що піднебінні мигдалики мають досить варіабельний потенціал в плані реакції антитільного типу з наявністю конкуренції антигенів і в даному досліджені клітини-антитілопродуценти превалюють в анамнестичній реакції по відношенню до антигенів грипу і *S. pyogenes*, в значно меншій мірі була виражена анамнестична гуморальна реакція по відношенню до VEB та N- і S-антигенам вірусу *SARS-CoV-2*.

Отримані дані свідчать про можливість стимуляції клітин піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт із застосуванням вітамінів D_3, С, мікроелементу цинку щодо антитілопродукції проти антигенів респіраторних вірусів. Це може свідчити про наявність у мигдаликах клітин імунологічної пам'яті або про підвищення вмісту антитіл в культуральній рідини, що є результатом виходу АТ із готових антитілопродуцентів в короткочасовий культурі. Найбільш ефективним щодо підвищення рівня АТ до вірусу грипу А і В був вплив аквадетриму, а на збільшення АСЛ-О в культурі клітин піднебінних мигдаликів більш впливав препарат цинку і вітамін С.

Ці дані свідчать про можливість комплексного застосування досліджуваних пребіотиків для підсилення як протигрипозної вакцинації навіть при її парентереальному проведенні, так і при проведенні мукозальної вакцинації мікробними препаратами. Можливо застосування широкого спектру вітамінів пре- і пробіотиків може бути вирішальним чинником в реалізації ефективного поствакцинального імунітету. Частково це положення підкріплюють дані ряду робіт із використання комплексного препарату БІОН-3 та інших комплексів, зокрема, за участі застосованих у роботі пребіотиків [12-14].

В плані перспективності роботи є два спрямування досліджень. Перше – це визначення дії на антитілогенез проти вірусів та мікробів додаткової кількості пребіотиків та змішаних комплексів з різних пребіотичних препаратів. Друге – це визначення ефективності пребіотиків при інтраназальній вакцинації із застосуванням наночасток, що є новим підходом у зміні існуючої парадигми парентеральної вакцинації [8, 10, 15]. Проведення в подальшому таких складних досліджень сприятиме створенню доклінічних моделей вакцин проти вірусів респіраторної групи нового типу для місцевого (інтраназального та перорального) застосування вже найближчим часом [7, 15, 16].

Висновки

1. Експериментальні дослідження in vitro щодо визначення впливу вірусних антигенів та пребіотиків на імунологічний потенціал клітин піднебінних мигдаликів є достовірним і швидким методом орієнтовної оцінки ступеню імунотропності препаратів різних груп.

2. Клітини піднебінних мигдаликів в умовах in vitro реагували підвищенням рівня антитіл до антигенів вірусів грипу А і В, *Human orthopneumovirus*, вірусу *Herpes simplex*-1, до стрептолізіну-О під дією введених в культури препаратів.

3. Найбільш активним було застосування мікроелементу цинку. Позитивні зміни у вигляді збільшення рівня антитіл до антигенів вірусів відмічені і у вітамінів D_3 та С.

References

1. Abaturov OE, Kryuchko TO, Agafonova OF, Dytyatkovsky VO, Ostapenko VP, Kolenko IO. Pathogenetic bases of development and possibilities of medication correction of the infectious process in pediatric practice. Kyiv: Julia print; 2016. 103 p. [In Ukrainian].
2. Antomonov MYu. [Mathematical processing and analysis of medical and biological data]. Kyiv:

Medical Center "Medinform"; 2018. 579 p. [In Ukrainian].
3. Drannik GM. [Clinical immunology and allergology]. Kyiv: Polygraph Plus; 2010. 552 p. [In Russian].
4. Zaikov S.V. Immunotropic properties of probiotics, vitamins and microelements. Klinichna immunolohiia. Alerholohiia. Infektolohiia. 2015;82-83 (3-4):21-28. [Article in Ukrainian].
5. Zabolotny DI, Melnykov OF, Spivak MYa, Kryvohatska LD, Gorlov AU, Serdiuk VG, Faraon IV, Sydorenko TV, Tymchenko MD, Babenko LP, Shevchuk AO. Experimental Intranasal Immunization against Respiratory Viruses. Mikrobiol. Z. 2021;83(5):82-9. https://doi.org/10.15407/microbiolj83.05.082.
6. Kaidashev IP, editor. Methods of clinical and experimental research in medicine. Poltava: Polymet; 2003. 320 p. [In Ukrainian].
7. Kuznetsova LV. [Treatment and prevention of acute respiratory disease on the background of therapies using complex Bion® 3]. Ukraïnskyĭ medychnyĭ chasopys. 2014;102(4):44-46. https://api.umj.com.ua/wp/wp-content/uploads/2014/07/42811.pdf. [Article in Ukrainian].
8. Melnikov OF, Zabolotna DD, Peleshenko NA, Rylska OG. Concept of local ethiologically appropriative vaccinacion. Proc. of 8th Intern. Symposium of Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airwais. Zurich 2013. abstr. 16; 32 (a).
9. Melnikov OF, Sambur MB, Rylska OG, Timchenko SV, Zabolotna DD, Vakhtina GA. [Immunological approaches to increasing the mucosal resistance of the upper respiratory tract]. Immunology and allergology: science and practice. 2017;(1):42-43.
10. Ainai A, van Riet E, Ryo Ito R, Kazuyuki Ikeda K, Kyosuke Senchi K, Tadaki Suzuki T, et al. Human immune responses elicited by an intranasal inactivated H5 influenza vaccine. Microbiol Immunol. 2020 Apr;64(4):313-325. doi: 10.1111/1348-0421.12775.
11. Fokkens WJ, Lund VJ, Hopkins C, Hellings PW, Kern R, Reitsma S, et al. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2020. Rhinology. 2020 Feb 20;58(Suppl S29):1-464. doi: 10.4193/Rhin20.600.
12. Benn CS, Fisker AB, Rieckmann A, Sørup S, Aaby P. Vaccinology: time to change the paradigm? Lancet Infect Dis. 2020 Oct;20(10):e274-e283. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30742-X.
13. Kabat EA, Meyer MM. Experimental immunochemistry / translated from English. Moscow: Meditsina; 1968. 680 p. [In Russian].
14. Morrow l, Gogineni V, Malesker M. Probiotic, prebiotic and symbiotic use in critically ill patiens. Curr Opin Crit Care. 2012 Apr;18(2):186-91. doi: 10.1097/MCC.0b013e3283514b17.
15. Shi R, Zeng J, Xu L, Wang F, Duan X, Wang Y. A combination vaccine against SARS-CoV-2 and H1N1 influenza based on receptor binding domain trimerized by six-helix bundle fusion core. EBioMedicine. 2022 Nov:85:104297. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104297.
16. Wang TT, Bournazos S, Ravetch JV. Immunological responses to influenza vaccination: lessons for improving vaccine efficacy. Curr Opin Immunol. 2018:53:124-129. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.026.

Надійшла до редакції 18.07.2024

© О.Ф. Мельников, Д.І. Заболотний, М.Д. Тимченко, І.В. Фараон, М.Б. Самбур, О.Д. Тупіцька, О.Г. Рильська, О.Ю. Бредун, Т.В. Сидоренко, В.О. Котов, 2024

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПРЕБІОТИКІВ НА ВМІСТ АНТИТІЛ ДО ВІРУСІВ ТА МІКРОБІВ РЕСПІРАТОРНОЇ ГРУПИ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН ПІДНЕБІННИХ МИГДАЛИКІВ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ТОНЗИЛІТ В ЕКСПЕРИМЕНТІ IN VITRO

[1]Мельников ОФ, [1]Заболотний ДІ, [1]Тимченко МД, [1]Фараон ІВ, [1]Самбур МБ, [1]Туліцька ОД, [1]Рильська ОГ, [2]Бредун ОЮ, [1]Сидоренко ТВ, [1]Котов ВО

[1]Державна установа «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка Національної академії медичних наук України»; email: elenamelnykova@gmail.com

[2]Національний університет охорони здоров'я імені П.Л. Шупика МОЗ України

А н о т а ц і я

В останні десятиріччя інтенсивно досліджуються активність та точки впливу пробіотиків, мікроелементних сполук та вітамінів, які відіграють суттєву роль кофакторів в підтриманні системи імунітету як локального так і системного, специфічного та вродженого на рівні стабільного гомеостазу. Враховуючи недостатню наукову інформацію щодо дослідження цього напрямку ***метою*** роботи було визначення

впливу пребіотиків на продукцію анамнестичних антитіл до вірусів та мікробів респіраторної групи клітинами піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт в експерименті in vitro.

Матеріал та методи: Дослідження проведено на культурах клітин мигдаликів, отриманих від 20 хворих на хронічний тонзиліт, яким за показаннями проводили тонзилектомію. Вік обстежених від 16 до 40 років, з них 14 були жіночої статі. В дослідні зразки перед культивуванням додавались різні пребіотичні препарати. До культури клітин мигдаликів до кожного зразка окремо додавали вітамін С в дозі 50 мкг, D_3 («Аквадетрим») – 25 одиниць, розчин цинку медичного в дозі 50 мкг. В контрольні проби до клітин додавали 2 мкг білку нормальної сироватки людини. Клітини в контрольних та дослідних разках культивувались при 37^0С протягом 24 год. Після 24-годинного культивування отримували супернатанти, в яких визначали антитіла до респіраторних вірусів: грипу А і В – реакцією гальмування гемаглютинації еритроцитів групи АВ, до N- і S-антигенів вірусу *SARS-CoV-2*, до капсидного антигену *Virus Epstein-Barr* (VEB), до *Human orthopneumovirus*, до вірусу *Herpes simplex* 1-го типу (HSV-1) методом імунофлюорисцентного аналізу, до стрептолізину-О *Streptococcus pyogenes* – АСЛ-О латексним методом, до протеогліканів *Klebsiella pneumoniae* реакцією непрямої гемаглютинації за Boyden. Статистистичну обробку отриманих результатів проводили з застосуванням однобічного непараметричного критерію «U» Манна-Уітні, а при аналізі $\log_2$ титрів АТ використовували параметричний метод t-Стьюдента. Розрахунки робили за допомогою пакетів програм відкритого доступу WIN PEPI та Біостат.

Результати: Встановлено, що на всі застосовані препарати не виявлено суттєвих реакцій з боку клітин мигдаликів за вмістом антитіл до антигенів вірусів *SARS-CoV-2* та *VEB*. Гемаглютиніни вірусу грипу виявляли в значущих титрах (1:16 і більше) в 17% досліджень, при дії препаратів цинку і вітаміну D_3 в 26% супенатантів. Серед дослідних зразків досліджених культур тонзилоцитів АСЛ-О активно продукувався в 35% зразків під дією вітаміну С, в 25% – D_3, в 50% – цинку. Крім того, вміст антитіл в культуральній рідині на антигени *Human orthopneumovirus* і *HSV-1* збільшувався під впливом мікроелементу цинку. За сумою позитивних впливів цей мікроелемент серед досліджуваних пребіотиків був найбільш активним. Низький рівень стимуляції застосованими пребіотиками вмісту антитіл до *Klebsiella pneumoniae* може частково свідчити про слабкий рівень інфікування і малоактивне формування в піднебінних мигдаликах клітин імунологічної пам'яті.

Дискусія: Можна припустити, що піднебінні мигдалики мають досить варіабельний потенціал щодо реакції антитільного типу з наявністю конкуренції антигенів і в даному досліджені клітини-антитілопродуценти превалюють в анамнестичній реакції по відношенню до антигенів грипу і *S. pyogenes*, значно менш вираженою була анамнестична гуморальна реакція по відношенню до *VEB* і N- та S-антигенів вірусу *SARS-CoV-2*. Отримані дані свідчать про можливість стимуляції клітин піднебінних мигдаликів хворих на хронічний тонзиліт щодо антитілопродукції проти антигенів респіраторних вірусів із застосуванням вітамінів D_3, С, мікроелементу цинку.

В плані перспективності роботи є два спрямування досліджень. Перше – це визначення дії на антитілогенез проти вірусів та мікробів додаткової кількості пребіотиків та змішаних комплексів з різних пребіотичних препаратів. Друге – це визначення ефективності пребіотиків при інтраназальній вакцинації із застосуванням наночасток, що є новим підходом у зміні існуючої парадигми парентеральної вакцинації. Проведення в подальшому таких складних досліджень сприятиме створенню доклінічних моделей вакцин проти вірусів респіраторної групи нового типу для місцевого (інтраназального та перорального) застосування вже найближчим часом.

Висновки: Експериментальні дослідження in vitro щодо визначення впливу вірусних антигенів та пребіотиків на імунологічний потенціал клітин піднебінних мигдаликів є достовірним і швидким методом орієнтовної оцінки ступеню імунотропності препаратів різних груп.

Клітини піднебінних мигдаликів в умовах in vitro реагували підвищенням рівня антитіл до антигенів вірусів грипу А і В, *Human orthopneumovirus*, вірусу *Herpes simplex*-1, до стрептолізину-О під дією введених в культури препаратів.

Найбільш активним було застосування мікроелементу цинку. Позитивні зміни у вигляді збільшення рівня антитіл до антигенів вірусів відмічені і у вітамінів D_3 та С.

Key words: піднебінні мигдалики, імунологічний потенціал, пребіотики, респіраторні інфекти.

STUDY OF THE INFLUENCE OF PREBIOTICS ON THE CONTENTS OF ANTIBODIES TO VIRUSES AND MICROBES OF THE RESPIRATORY GROUP IN PALATINE TONSIL CELL CULTURE OF PATIENTS WITH CHRONIC TONSILLITIS IN EXPERIMENT IN VITRO

[1]Melnikov OF, [1]Zabolotny DI, [1]Timchenko MD, [1]Pharaon IV, [1]Sambur MB, [1]Tupitska OD, [1]Rylska OG, [2]Bredun OYu, [1]Sydorenko TV, [1]Kotov VO

[1] State Institution «O. S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; email: elenamelnykova@gmail.com

[2]Shupyk National Healthcare University of Ukraine

A b s r a c t

Purpose: In recent decades, the activity and points of influence of probiotics, microelement compounds and vitamins, which play a significant role as cofactors in maintaining the immune system, both local and systemic, specific and innate, at the level of stable homeostasis, have been intensively studied. Given the insufficient scientific information on research in this direction, the aim of the research was to determine the effect of prebiotics on the production of anamnestic antibodies to viruses and microbes of the respiratory group by cells of the palatine tonsils of patients with chronic tonsillitis in an in vitro experiment.

Material and methods: The study was conducted on tonsil cell cultures obtained from 20 patients with chronic tonsillitis who underwent tonsillectomy according to indications. The age of the examinees ranged from 16 to 40 years, of which 14 were female. Cells in the control and experiment were cultivated at 37^0C for 24 hours. Various prebiotic preparations were added to the experimental samples before cultivation. To the culture of tonsil cells to each one separately was added Vit C in a dose of 50 μg, D_3-aquadetrim – 25 units, zinc solution – 50 μg. 2 μg of normal human serum protein was added to the control samples. After 24-hour cultivation, supernatants were ob tained, in which antibodies to respiratory viruses were determined: to influenzaviruses A- and B- by the reaction of inhibition of hemagglutination of erythrocytes of the AB group, to N- and S - antigens of the *SARS-CoV-2* virus, to the capsid antigen of the *EBV* virus (Euriimmen), to *Human orthopneumovirus*, to *herpes simplex virus type 1 (HSV-1)* by ELISA method, to streptolysin-O of *Streptococcus pyogenes* (ASL-O) by latex method and proteglycans *Klebsiella pneumoniae* by reaction of indirect hemagglutination according to Boyden. The statistical processing of the obtained results was carried out using the one-sided non-parametric "U" test of Mann-Whitney, and the parametric t-Student method was used in the analysis of $\log_2$ titers of AB. Calculations were made using WIN PEPI and Biostat open access software packages

Results: It was established that no significant reactions of tonsil cells were detected to all the drugs used in the content of antibodies to antigens of the *SARS-CoV-2* and *VEB* viruses. Hemagglutinins of the influenza virus were detected in significant titers (1:16 or more) in 17% of studies, under the influence of zinc and vitamin D_3 preparations – in 26% of supenatants. ASL-O was actively produced under the influence of vitamin C in 33%, D_3 – in 25%, and zinc in 50% of all examined tonsilocyte cultures. In addition, the content of antibodies to *Human orthopneumovirus* and *HSV-1*-antigens in the culture fluid increased under the influence of the trace element zinc. According to the sum of positive effects, this trace element was the most active among the studied prebiotics. The low level of stimulation of the content of antibodies to *K. pneumonia* by these prebiotics may partially indicate a low level of infection and the low-active formation of immunological memory cells in the palatine tonsils.

Discussion: It can be assumed that the palatine tonsils have a rather variable potential in terms of an antibody-type reaction with the presence of antigens competition, and in this case, the studied antibody-producing cells prevail in the anamnestic reaction to antigens of influenza and *S. pyogenes* , the anamnestic humoral reaction to VEB and N- and S- antigens of the SARS-CoV-2 virus was much less pronouncedThe obtained data indicate the possibility of stimulation of cells of the palatine tonsils of patients with chronic tonsillitis with regard to antibody production against antigens of respiratory viruses with the use of vitamins D_3, C, trace element zinc.

In terms of the perspective of the work, there are two directions of research. The first is the determination of the effect on antibodyogenesis against viruses and microbes of an additional amount of prebiotics and mixed complexes of various prebiotic preparations. The second is the determination of the effectiveness of prebiotics during intranasal vaccination using nanoparticles, which is a new approach in changing the existing paradigm of parenteral vaccination. Further conducting of such studies will contribute to the creation of preclinical models of vaccines against viruses of the respiratory group of a new type for local (intranasal and oral) use in the near future.

Conclusions: In vitro experimental studies on determining the effect of viral antigens and prebiotics on the immunological potential of cells of the palatine tonsils are a reliable and quick method of approximate assessment of the degree of immunotropy of drugs of different groups. Cells of the palatine tonsils in vitro responded by increasing the level of antibodies to the antigens of influenza A and B viruses, Human orthopneumovirus and HSV-1, to streptolysin-O of S. pyogenes under the influence of the drugs introduced into the cultures. The use of the trace element zinc appears to be the most active. Positive changes regarding the level increase of antibodies to virus antigens were also noted under the action of vitamins D_3 and C.

Key words: palatine tonsils, immunological potential, prebiotics, respiratory infections.