

## Imunostimularea locală cu celule mononucleate autologe în tratamentul complex al amigdalitei cronice compensate la copii

Ion Ababii<sup>1</sup>, Serghei Ghinda<sup>2</sup>, Lucian Danilov<sup>\*1</sup>, Viorel Nacu<sup>3</sup>, Mihail Maniuc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Catedra de otorinolaringologie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Laboratorul de imunologie și alergologie, Institutul de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>3</sup>Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova.

### Autor corespondent:

Lucian Danilov, dr. șt. med., conf. univ.

Catedra de otorinolaringologie

Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”

bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004

e-mail: luciano@mail.md

## Local immunostimulation with autologous mononuclear cells in the complex treatment of compensated chronic tonsillitis in children

Ion Ababii<sup>1</sup>, Serghei Ghinda<sup>2</sup>, Lucian Danilov<sup>\*1</sup>, Viorel Nacu<sup>3</sup>, Mihail Maniuc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of otorhinolaryngology, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Laboratory of immunology and allergology, Chiril Draganiuc Institute of Ftiziopneumology, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>3</sup>Laboratory of tissue engineering and cell culture, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova.

### Corresponding author:

Lucian Danilov, PhD, associate professor

Chair of otorhinolaryngology

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy

165, Ștefan cel Mare și Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova

e-mail: luciano@mail.md

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Nu a fost cercetat, până în prezent, efectul clinico-imunologic al aplicării celulelor mononucleate autologe asupra țesutului limfoepitelial faringian în amigdalita cronică la copii.

### Ipoteza de cercetare

Tratamentul de imunostimulare locală prin aplicare de celule mononucleate autologe în amigdalita cronică compensată la copii ameliorează tabloul clinico-imunologic și accelerează remisia maladiei.

### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Rezultatele obținute demonstrează eficiența clinico-imunologică a metodei de tratament prin aplicarea locală a celulelor mononucleate autologe la copiii cu amigdalită cronică compensată.

### What is not known yet, about the topic

Currently there is a lack of scientific researches on clinical and immunological effect of application of autologous mononuclear cells on pharyngeal lympho-epithelial tissue in chronic tonsillitis in children.

### Research hypothesis

Treatment with local immunological stimulation by the means of local application of autologous mononuclear cells in chronic compensated tonsillitis in children improves the clinical state and accelerates remission.

### Article's added novelty on this scientific topic

Scientific results prove the clinical and immunological effectiveness of the complex conservative treatment with local application of autologous mononuclear cells in children with compensated chronic tonsillitis.

### Rezumat

**Introducere.** Elaborarea criteriilor de diagnostic în amigdalita cronică la copii și argumentarea tacticii de terapie conservatoare complexă pentru păstrarea amigdalelor palatine ca organ important în imunitatea locală și generală sunt direcții prioritare în domeniul otorinolaringologiei pediatrice. Corectitudinea alegerii opțiunii terapiei conservatoare a amigdalitei

### Abstract

**Introduction.** The priority directions in pediatric otorhinolaryngology are development of diagnostic criteria in chronic tonsillitis in children and argumentation of complex conservative therapy tactics to preserve palatine tonsils as important organs in local and general immunity. Conservative therapy tactics in compensated chronic tonsillitis are

cronice compensate este confirmată în majoritatea cazurilor. Cercetările efectului aplicării celulelor mononucleate autologe în diferite patologii medicale, realizate în Republica Moldova, au stabilit că acestea măresc local, în zona afectată, producerea anumitor citokine cu proprietăți antiinflamatoare, stimulează proliferarea celulelor ce iau parte la procesele reparatorii și reconstructive (macrofagi, fibroblaști, neutrofile etc.) și grăbesc normalizarea statutului imunitar sistemic. La momentul actual, sunt necesare investigații comparative clinico-imunologice referitoare la eficiența aplicării locale a celulelor mononucleate autologe în tratamentul complex al amigdalitei cronice compensate la copii, pentru aprobarea lor clinică.

**Material și metode.** În studiu au fost incluși 44 de copii cu amigdalită cronică compensată, care au fost repartizați în 2 loturi: 22 de copii, cărora le-a fost aplicat tratamentul terapeutic standard incluzând și terapia imunomodulatoare locală (lotul terapie imunomodulatoare locală, TIML) și 22 de copii, care au beneficiat numai de tratament terapeutic standard (lotul tratament terapeutic standard, TTS).

**Rezultate.** La copiii tratați prin imunostimulare locală, spre deosebire de pacienții tratați prin metodă obișnuită, s-a apreciat o scădere mai importantă a nivelelor de complexe imune circulante, (CIC) [PEG-8,0%]: în lotul TIML – de la 249,0±21,4 u.d.o. la 189,0±20,1 u.d.o., iar în lotul TTS – de la 274,0±31,7 u.d.o. la 266,0±20,4 u.d.o., respectiv până și după tratament. Sensibilitatea limfocitelor T față de antigenii streptococului s-a micșorat mai pronunțat la copiii lotului TIML (2,6±0,32%, până la tratament și 1,5±0,26%, după tratament) față de copiii lotului TTS (3,0±0,33%, până la tratament și 2,5±0,31%, după tratament). Indicatorii activității funcționale a limfocitelor T s-au majorat semnificativ după tratament în lotul TIML (66,4±0,75% vs. 70,4±0,79%), comparativ cu lotul TTS (68,3±1,14% vs. 69,4±0,83%). Conținutul total al limfocitelor B s-a micșorat doar la copiii lotului TIML (9,5±0,55%, până la tratament vs. 7,6±0,40%, după tratament); în lotul TTS valorile respective au avut o tendință nefavorabilă, de creștere (9,4±0,63% vs. 9,8±0,33%).

**Concluzii.** Terapia locală cu celule mononucleate autologe exercită o acțiune complexă asupra rezistenței preimune și reactivității imune la copiii cu amigdalită cronică compensată, care se traduce printr-un efect clinic pozitiv exprimat.

**Cuvinte cheie:** amigdalită cronică, imunitate locală, celule mononucleate autologe.

## Introducere

Amigdalita cronică reprezintă una dintre cele mai dificile și complexe probleme ale otorinolaringologiei moderne. În pofida interesului sporit al savanților față de studierea etiopatogenei amigdalitei cronice și obținerii anumitor rezultate în tratamentul patologiei menționate, inflamația cronică a țesutului limfoepitelial amigdalian faringian la copii se supune, totuși, insuficient controlului terapeutic. În acest domeniu, sarcina cercetătorilor constă în elaborarea criteriilor de diagnostic și pronostic, care ar ajuta clinicistul în tratamentul eficient al amigdalitei cronice la copii. În prezent, o direcție prioritară în

confirmat în most cases. Researches on the effect of autologous mononuclear cell application in various pathologies in Moldova have determined the fact that they increase locally, in the affected area, the production of certain cytokines with anti-inflammatory properties, stimulate proliferation of cells taking part in restorative and reconstructive processes (macrophages, fibroblasts, neutrophils etc.) and accelerate the normalization of the systemic immune status. Currently, comparative clinical and immunological investigations are necessary to be carried out on efficiency of local application of autologous mononuclear cells in the complex treatment of compensated chronic tonsillitis in children for clinical approval.

**Material and methods.** The study included 44 children with compensated chronic tonsillitis who were divided into 2 groups: 22 children were applied standard treatment including local immunomodulatory therapy (group TIML) and 22 children undergoing only standard treatment (group TTS).

**Results.** Children receiving local immunostimulation, as compared to patients treated with conventional method, were recorded to have a more significant decrease in the levels of CIC indices (PEG. 8.0%) – 249.0±21.4 u.d.o. – before treatment and 189.0±20.1 u.d.o. after treatment (group TIML); 274.0±31.7 u.d.o. before treatment and 266.0±20.4 u.d.o. after treatment (group TTS). Sensitivity of T lymphocytes to streptococcus antigens decreased more pronouncedly in children of group TIML (2.6±0.32% before treatment and 1.5±0.26% after treatment) than in children of group TTS (3.0±0.33% – before treatment and 2.5±0.31% – after treatment). After treatment, indices of T lymphocyte functional activity were conclusively increased in children of group TIML (66.4±0.75% – before treatment and 70.4±0.79% – after treatment) compared to children of lot TTS (68.3±1.14% – before treatment and 69.4±0.83% – after treatment). The total content of B lymphocytes decreased only in children of group TIML (9.5±0.55% – before treatment and 7.6±0.40% – after treatment). There was an unfavorable increasing trend in content of B lymphocytes after therapy in group TTS (9.4±0.63% – before treatment and 9.8±0.33% – after treatment).

**Conclusions.** Local therapy with autologous mononuclear cells has a complex action upon the changes of pre-immune resistance and immune reactivity state in children with compensated chronic tonsillitis, which corresponds to a high positive clinical effect.

**Key words:** chronic tonsillitis, local immunity, autologous mononuclear cells.

## Introduction

Chronic tonsillitis is one of the most difficult and complex problems of modern otorhinolaryngology. Despite the scientists' interest in studying etiopathogenesis of chronic tonsillitis and great results achieved in otorhinolaryngology in the treatment of this pathology, chronic inflammation of the pharyngeal lymphoepithelial tonsillar tissue in children has no tendency to decrease numerically and it is the focus of specialized pediatric medical otorhinolaryngology. The task of the researcher is to

studierea tratamentului amigdalitei cronice la copii este considerată imunomodularea locală, efectuată în baza anumitor parametri de imunoreactivitate specifică. Scopul terapeutic final este păstrarea amigdalelor palatine ca și organ, important pentru imunitatea locală și generală [1].

Fără creșterea reactivității imunitare, rezultate clinice pozitive în cazul amigdalitei cronice sunt greu de obținut. Considerăm că este imposibil de a soluționa problema doar cu antibioticoterapie, care, la prescriere îndelungată și, mai ales, necontrolată, din contră, reduce imunoreactivitatea organismului. Din acest motiv, devine limpede interesul clinicienilor față de posibilitatea utilizării tratamentelor imunotrope [2].

Terapia cu celule mononucleate autologe reprezintă o tehnologie modernă de terapie extracorporală adaptivă. Studiile ultimilor ani au demonstrat rolul major al citokinelor sintetizate de celulele mononucleate autologe în procesele inflamatorii și regenerative. Aceste celule, fiind activate, capătă noi calități, cu impact asupra macrofagelor, fibroblaștilor și neutrofilelor – principalele celule implicate în procesele de regenerare și inflamție. Interleukina 8 (IL-8), ca și factorul necrozei tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukina 6 ș. a., aparțin cascadei proinflamatorii. Mediatorul (chemokina) cel mai timpuriu al inflamației este IL-8, rolul principal al cărui este cel de chemoattractant și de activare a neutrofilelor (degranulare, migrare în focar, exprimarea pe suprafață a moleculelor de adeziune). Concentrații sporite de IL-8 în sângele periferic se determină, prevalent, în sepsis, pneumonii masive, infecții ale nou-născutului – adică, în cazul existenței unor zone extinse de afectare [3-6]. Prin urmare, considerăm că utilizarea celulelor mononucleate autologe activate vor avea un impact clinic pozitiv prin fortificarea interacțiunilor mediatore în sistemul imunitar. În particular, ele reglează producția de proteine de fază acută a inflamației, sunt responsabile de activarea celulelor T, stimulează proliferarea și reactivează procesele de regenerare în țesuturile lezate.

Avantajele utilizării celulelor autologe par evidente: lipsa conflictului imun, reducerea la minim a riscului de transmitere a maladiilor hemotransmisibile, scurtarea duratei programelor de tratament și nu în ultimul rând, lipsa problemelor de ordin bioetic [7].

În această ordine de idei, scopul cercetării noastre a fost demonstrarea din punct de vedere clinico-imunologic a eficienței tratamentului de imunostimulare locală prin aplicare de celule mononucleate autologe în amigdalita cronică compensată la copii.

### Material și metode

Studiul a fost efectuat la baza clinică a Catedrei de otorinolaringologie din Spitalul de Copii „Emilian Coțaga”, Chișinău. Proiectul de cercetare și protocolul de studiu au fost aprobate de Comitetul de Etică a Cercetării al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (proces-verbal nr. 5 din 19.12.2013, președinte CEC – Mihail Gavriluc, dr. hab. șt. med., prof. univ.). Având în vedere că studiul a fost efectuat pe copii, acordul informat în scris a fost obținut de la părinții acestora.

develop diagnostic and prognostic criteria of chronic tonsillitis in children and help the clinician in argumentation of therapeutic tactics. At present, a priority direction in this medical field is to develop new methods of complex conservative treatment of chronic tonsillitis in children, based on advanced technologies for immune explorations to keep palatine tonsils as an important organ in local and general immunity [1].

It is difficult to achieve positive clinical outcomes in chronic tonsillitis without raising the immunological reactivity level, because it is impossible to solve the problem only by using antibiotic therapy, the uncontrolled and prolonged use of which decreases immunological reactivity of the organism. Therefore, it is obvious the increasing interest of clinicians to immunotropic preparations [2].

Autologous mononuclear cell therapy is a modern technology of adaptive extracorporeal treatment. Studies performed in recent years have demonstrated the key role of cytokines produced by autologous mononuclear cells in inflammatory and regenerative processes. These activated cells acquire new properties, having an impact on macrophages, fibroblasts and neutrophils, which are the main cells in regeneration and inflammation processes. Interleukin-8 (IL-8) as well as tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 etc., belong to pro-inflammatory cascade. IL-8 is the earliest mediator (chemokine) of inflammation. Its major role is to act as chemoattractant and neutrophil activation: neutrophil degranulation and stimulation, as well as enhancement of phagocytic migration to the site of infiltration of foreign pathogens and activation of adhesion molecules by phagocytes. High levels of IL-8 in the peripheral blood are prevalently determined in infectious diseases with severe evolution (sepsis, complicated pneumonia, neonatal infections etc.) and a large affected area [3-6]. Therefore, positive effect is achieved and it is mainly due to activated autologous mononuclear cells, which produce a number of cytokines that provide mediating interactions in the immune system. In particular, they regulate the production of proteins in the acute stage of inflammation, being responsible for T cell activation, stimulating proliferation and reactivating regenerative processes in damaged tissues.

The advantages of using autologous cells are obvious: lack of immune conflict; minimizing the possibility of contamination of the patient with blood-transmissible diseases; it is favorable morally and ethically, and the duration of treatment is relatively short [7].

The purpose of research is to prove the clinical and immunological effectiveness of the complex treatment of chronic compensated tonsillitis in children by local immunostimulation with autologous mononuclear cell application.

### Material and methods

The study was held in the Otorhinolaryngology University Clinic, “Emilian Cotaga” Children Hospital from Chisinau. The study was approved by the Research Ethics Committee of *Nicolae Testemitanu* State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova, based on the patient's informed consent (EC decision no. 5 from 19.12.2013, presi-



Studiul a inclus 44 de copii cu amigdalită cronică compensată (conform clasificării din 1975 a lui Soldatov I. B.) [8] care, în funcție de tipul tratamentului, au fost repartizați în 2 loturi egale de studiu. Lotul 1 de studiu, constituit din 22 de copii cu amigdalită cronică compensată, a beneficiat de tratament standard, suplimentat cu aplicarea locală de celule mononucleate autologe; acest lot a fost numit în continuare „lotul terapiei imunomodulatorie locale, TIML”. Lotul 2, constituit din 22 de pacienți similari, a beneficiat doar de tratament standardizat (lotul „tratament terapeutic standardizat”, TTS).

Tratamentul terapeutic standardizat a inclus: înlăturarea focarului de infecție din amigdalele palatine prin spălarea lacunelor amigdalene cu soluție de nitrofurazol 1:5000, badijonarea suprafeței amigdalelor palatine cu soluție de lugol, administrarea *per os* a desensibilizantului difenhidramină și a unui complex de vitamine.

Tratamentul imunomodulator local s-a efectuat prin infiltrarea în spațiul periamigdalian al celulelor mononucleate autologe activate, provenite din sângele venos al pacientului. Acestea au fost separate din eșantionul de sânge și apoi activate printr-o tehnologie originală, elaborată în Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare al IP USMF „Nicolae Testemițanu” (separare în gradient de concentrație cu centrifugare, apoi – cultivare pe mediu nutritiv special, timp de 5 zile, într-un incubator cu CO<sub>2</sub>).

Loturile au fost identice din punctul de vedere al vârstei (11,8±0,8 vs. 11,6±1,1 ani) și repartizării pe sexe a copiilor.

La toți copiii incluși în studiu, li s-au efectuat teste imunologice complexe.

Pentru determinarea activității funcționale a limfocitelor T, s-a folosit reacția de transformare blastică (conform Ghinda S., 1982) [9]. Determinarea nivelurilor de subpopulații ale limfocitelor T și B (CD3, CD4, CD8, CD16, CD20) s-a efectuat prin citometrie de flux (citometru de flux *PAS I, Partec GmbH*, Münster, Germania). Pentru identificarea celulelor fagocitate, s-au utilizat indicii fagocitari și numărul fagocitar (conform Pavlovici S., 1998) [10]. Activitatea fagocitară a neutrofilelor s-a apreciat cu testul albastru-nitrat de tetrazoliu (engl. „*Nitro-Blue-Tetrazolium*”, NBT), conform Park B. și coaut. (1968) [11].

Conținutul de complexe imune circulante s-a determinat conform procedurii descrise de Grinevici I. A. și Kameneț L. I. (1986) [12], în varianta adaptată de Ghinda S. și coaut. (2008) [13]. Antistreptolizina-O, factorul reumatoid și proteina C-reactivă s-au determinat prin metoda testului de aglutinare (chiturile *HumatexASO*, *HumatexRF*, *HumatexCRP*, Human, Wiesbaden, Germania). Indicii leucocitari de imunoreactivitate s-a determinat cu ajutorul procedurii elaborate de Ghinda S. și coaut. (1996) [14]. Starea reacțiilor de adaptare a organismului s-a apreciat conform metodei propuse de Ghinda S. și coaut. (1997) [15].

Activitatea hemolitică a complementului (CH<sub>55</sub>) s-a determinat cu ajutorul procedurii propuse de Reznicova L. S. (1967) [16]. Conținutul imunoglobulinelor A, G, M s-a determinat cu ajutorul analizei imunoenzimatică pe suport solid (*Vector-Best Ltd*, Koltsovo, regiunea Novosibirsk, Rusia), conform instrucțiunilor producătorului. IgE total s-a apreciat cu ajutorul ana-

dent – Prof. Mihail Gavriiliuc, PhD). Taking in consideration that the study was made on children, written informed consent was signed by their parents.

The study included 44 children with compensated chronic tonsillitis who, depending on the type of treatment, were divided into two study groups: 22 children with compensated chronic tonsillitis who were applied standard treatment and local immunomodulatory therapy with activated autologous mononuclear cells (group TIML – standard treatment and autologous mononuclear cell application) and 22 children with compensated chronic tonsillitis were subject only to standard treatment (group TTS).

Standard treatment consisted of: removal of the infection focus off the palatine tonsils by washing the tonsillar holes with Nitrofurazol solution 1:5000 in order to restore the role of drainage of the palatine tonsillar crypts and to stimulate their functional status, embrocation of the palatine tonsil surface with Lugol solution, oral administration of diphenhydramine desensitizer and vitamin complex.

Local immunomodulatory treatment was performed by infiltrating activated autologous mononuclear cells in peritonsillar space which are priorly separated from the venous blood of the patient and are prepared in the Laboratory of Tissue Engineering and Cell culture of *Nicolae Testemitanu* SUMPh. Mononuclear cells are obtained by separation in the gradient of centrifugation concentration. being then cultured in a special nutrient medium in CO<sub>2</sub> incubator for 5 days.

The structure of investigational groups showed uniform distribution by sex and age of children included in the study. The average age of children in group TIML was 11.8±0.8 years and 11.6±1.1 years in group TTS.

All children, subjects of the study, benefited from complex immunological investigations.

To determine the total lymphocyte content, blast transformation reaction was used (Ghinda S., 1982) [9]. Flow cytometry method (*PAS I, Partec GmbH*, Münster, Germany) was used to determine the levels of subpopulations of T and B lymphocytes (CD3, CD4, CD8, CD16, CD19). To determine phagocytic cells, the phagocytic index and phagocytic number were used (Pavlovici S., 1998) [10]. The phagocytic activity of neutrophils was assessed in NBT test (*Nitro-Blue-Tetrazolium*) (B. H. Park *et al.*, 1968) [11].

The content of circulating immune complexes was determined according to the procedure described by I. A. Grinevici and L. I. Kamene (1986) [12] in version adapted by S. Ghinda *et al.* (2008) [13]. Antistreptolysine-O, rheumatoid factor and C-reactive protein were determined by the agglutination test (*HumatexASO*, *HumatexRF*, *HumatexCRP* kits were used, Human, Wiesbaden, Germany). Leukocyte immunoreactivity index was determined using the method developed by S. Ghinda *et al.* (1996) [14]. The status of the body adaptation reactions was appreciated according to the method proposed by S. Ghinda *et al.* (1997) [15].

Hemolytic complement activity (CH<sub>55</sub>) was determined using the method proposed by L. S. Reznicova (1967) [16]. The content of immunoglobulins A, G, M was determined using enzyme immunoassay on solid support, (*Vector-Best*

lizei imunoenzimatice pe suport solid (*UBI Magiwell*, United Biotech Inc., Mountain View, CA, SUA), conform instrucțiunilor producătorului.

Analiza statistică a datelor s-a efectuat cu modulele statistice incorporate ale programului Excel (*Windows 2007*, Redmond, Washington, WA, SUA).

## Rezultate

Conform datelor analizei imunologice, indicii leucocitari până la tratament în ambele loturi erau aproximativ aceiași. După tratament, conținutul de leucocite la copiii lotului TIML a fost mai redus decât la cei din lotul TTS ( $t=2,9$ ;  $p<0,1$ ). Cantitatea de neutrofilele segmentate, care până la tratament a fost identică în ambele loturi, după tratament s-a redus semnificativ în lotul TIML ( $t=3,35$ ;  $p<0,01$ ), nu și în lotul TTS ( $t=2,67$ ;  $p<0,05$ ). Cantitatea de neutrofile nesegmentate a scăzut semnificativ după ambele scheme terapeutice aplicate (TIML:  $t=2,93$ ;  $p<0,01$  vs. TTS:  $t=2,55$ ;  $p<0,05$ ). Până la tratament, copiii din lotul TIML au avut sistemul reticulo-endotelial hiperactiv, iar după tratament, acesta și-a normalizat activitatea (tablou confirmat de scăderea semnificativă a conținutului de monocite,  $t=5,2$ ;  $p<0,001$ ). În lotul TTS nu s-au constatat devieri semnificative ale conținutului de monocite.

Analiza modificărilor survenite în expresia intoxicației tonsilogene a demonstrat că până la tratament, indicatorii acestei stări au fost similari. În lotul TIML, nivelele CIC (PEG-2,5%, cu masă moleculară mare și care manifestă cea mai scăzută toxicitate; PEG-4,2%, cu masa moleculară medie și o toxicitate moderată; PEG-8,0%, cu greutate moleculară mică și toxicitate sporită) s-au diminuat semnificativ după tratament, nu și în cazul lotului TTS (Tabelul 1).

### Tabelul 1

Indicatorii expresiei intoxicației tonsilogene în loturile investigate până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după trata- ment	până la tratament	după trata- ment
CIC‡ (PEG-2,5%), u.d.o.§	10,5±1,32	6,7±0,92§	11,1±1,36	10,0±0,83**
CIC (PEG-4,2%), u.d.o.	27,1±2,77	19,2±1,51§	31,8±3,19	30,4±2,13**
CIC (PEG-8,0%), u.d.o.	249,0±21,4	189,0±20,1§	274,0±31,7	266,0±20,4**

Notă: \* – lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † – lot tratament terapeutic standardizat; § – unitate de densitate optică; ‡ – complexe imune circulante; \*\* – semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § – semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament.

Capacitatea de fagocitare a bacteriilor înglobate, reflectată prin testul NBT, a fost identică în ambele loturi până la tratament și a crescut în dinamică mai puternic în lotul TIML. Numărul neutrofilelor capabile de fagocitoză (NF) și activitatea fagocitară a acestora (IF) au fost aproximativ egale între loturi până la tratamentele aplicate; după – a crescut statistic semnificativ doar la copiii din lotul TIML (Tabelul 2).

Titrele limfocitelor CD16 (killeri naturli) au avut aceleași niveluri în ambele loturi până la tratamentele aplicate. În di-

liza, Koltsovo, Novosibirsk, Russia), according to the enclosed instructions. Total IgE was assessed using enzyme immunoassay on solid support, (*UBI Magiwell*, United Biotech Inc., Mountain View, CA, USA) according to the enclosed instructions.

Statistical analysis of materials was made using statistical evaluation methods included in Excel (*Windows 2007*, Redmond, Washington, WA, USA).

## Results

According to immunological analysis, leukocyte indices before treatment were about the same in both groups. After treatment, the content of leukocytes in children of group TIML was conclusively lower ( $t=2.9$  and  $p<0.1$ ), compared to children in investigational group TTS. Segmented neutrophil levels were the same before treatment in investigational groups, a genuine decrease of these levels being observed after treatment. But it was more clearly outlined in children of investigational group TIML ( $t=3.35$  and  $p<0.01$ ) than in children of group TTS ( $t=2.67$  and  $p<0.05$ ). The content of non-segmented neutrophils decreased genuinely according to both therapeutic schemes applied, but this level of decrease was higher in children of group TIML ( $t=2.93$  and  $p<0.01$ ) compared to children of investigational group TTS ( $t=2.55$  and  $p<0.05$ ). Children of investigational group TIML had a reactive reticuloendothelial endoplasmic system before treatment; its levels of activity normalized after treatment. The picture was confirmed by the conclusive decrease of the monocyte content ( $t=5.2$  and  $p<0.001$ ). The content of monocytes remained at a high level in children of investigational group TTS even after therapy.

Analysis of changes in tonsilogenic intoxication expression showed that before treatment the condition indices were at the same level. CIC levels (PEG-2.5% – with high molecular weight and lowest toxicity; PEG-4.2% – with average molecular weight and moderate toxicity; PEG-8.0% – with low molecular weight and higher toxicity) in children of investigational group TIML decreased veridically after treatment (Table 1).

### Table 1

Indices of tonsilogenic intoxication expression in groups investigated before and after

Parametri	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
CIC‡ (PEG-2.5%). u.d.o.§	10.5±1.32	6.7±0.92§	11.1±1.36	10.0±0.83**
CIC (PEG-4.2%). u.d.o.	27.1±2.77	19.2±1.51§	31.8±3.19	30.4±2.13**
CIC (PEG-8.0%). u.d.o.	249.0±21.4	189.0±20.1§	274.0±31.7	266.0±20.4**

Note: \* – lot with local immunomodulatory therapy. with autologous mononuclear cells; † – lot with standard therapeutic treatment; § – optical density unit; ‡ – circulating immune complexes; \*\* – statistically significant between study groups. after the treatment; § – statistically significant in group TIML. series before and after the treatment.

Phagocytic ability of engulfed bacteria. analyzed by NBT test data with the same levels in both groups investigated before treatments applied, showed a follow-up increase, but this level was higher in children of group TIML. The number of

**Tabelul 2**

Unii indici ai fagocitozei în loturile investigate până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după tratament	până la tratament	după tratament
Testul NBT <sup>§</sup> , u.c. <sup>‡</sup>	0,12±0,003	0,13±0,003 <sup>§</sup>	0,12±0,004	0,13±0,003 <sup>††</sup>
NF <sup>¶</sup> , %	76,1±1,89	84,0±1,80 <sup>§</sup>	78,2±1,30	79,9±0,91 <sup>**</sup>
IF <sup>  </sup> , u.c.	4,6±0,28	5,5±0,24 <sup>§</sup>	4,9±0,25	5,5±0,17

Notă: \* - lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † - lot tratament terapeutic standardizat; § - testul cu nitro-blue tetrazolium; ‡ - unități convenționale; ¶ - numărul fagocitar; || - indexul fagocitar; \*\* - semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § - semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament; †† - semnificație statistică în lotul TTS, seriile până și după tratament.

namică, acestea au prezentat o tendință de descreștere mai evidentă în lotul TIML. Activitatea hemolitică totală a complementului (AHTC), care era similară până la tratamentele aplicate, după - s-a intensificat la copiii ambelor loturi de studiu, dar mai expresiv - la copiii lotului TIML (t=5,48; p<0,001), comparativ cu TTS (t=3,49; p<0,01). S-a constatat o tendință de majorare a cantității de anticorpi naturali după tratament, aceasta fiind mai expresivă la copiii lotului TIML. S-a observat scăderea mai evidentă a vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH) la copiii lotului TIML față de TTS (t=2,93; p<0,01 vs. t=2,23; p<0,05), Tabelul 3.

**Tabelul 3**

Conținutul unor markeri imunitari în sângele pacienților cu amigdalită cronică până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după tratament	până la tratament	după tratament
CD16 <sup>§</sup> , %	14,4±0,56	13,7±0,68	14,9±0,70	14,5±0,43
AHTC (CH <sub>50</sub> ) <sup>‡</sup> , U/ml	54,3±1,26	63,5±1,10 <sup>§</sup>	50,3±0,73	54,5±0,96 <sup>†††</sup>
Anticorpii naturali, ln al titrului	2,2±0,11	2,5±0,08	2,2±0,11	2,3±0,07 <sup>**</sup>
VSH, mm/oră	6,0±0,65	3,6±0,44 <sup>§</sup>	8,1±0,88	5,5±0,79 <sup>†††</sup>

Notă: \* - lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † - lot tratament terapeutic standardizat; § - cluster de diferențiere, prezent pe suprafața killerilor naturali; ‡ - activitatea hemolitică totală a complementului; \*\* - semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § - semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament; †† - semnificație statistică în lotul TTS, seriile până și după tratament.

Conținutul eozinofilelor după tratament s-a micșorat veridic doar la copiii lotului TIML (t=3,16; p<0,01), pe când la copiii lotului TTS, conținutul eozinofilelor a continuat să rămână la un nivel înalt. Conținutul bazofilelor nu s-a modificat, indiferent de tratamentele aplicate. Conținutul IgE după tratament a scăzut veridic doar la copiii lotului TIML (t=2,98; p<0,01). Indicatorul de imunoreglare CD4/CD8 în dinamica tratamentelor aplicate a rămas nemodificat. Testul de reactivitate auto-

**Table 2**

Some indices in lots investigated before and after the treatment

Indices	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
NBT <sup>§</sup> test, c.u. <sup>‡</sup>	0.12±0.003	0.13±0.003 <sup>§</sup>	0.12±0.004	0.13±0.003 <sup>††</sup>
PN <sup>¶</sup> , %	76.1±1.89	84.0±1.80 <sup>§</sup>	78.2±1.30	79.9±0.91 <sup>**</sup>
PI <sup>  </sup> , c.u.	4.6±0.28	5.5±0.24 <sup>§</sup>	4.9±0.25	5.5±0.17

Note: \* - lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † - lot with standard therapeutic treatment; § - nitro-blue tetrazolium test; ‡ - conventional units; ¶ - phagocytic number; || - phagocytic index; \*\* - statistically significant between study groups, after the treatment; § - statistically significant in group TIML, series before and after the treatment; †† - statistically significant in group TTS, series before and after the treatment.

neutrophils capable of phagocytosis (PN) and their phagocytic activity (PI) is approximately the same before treatments applied, after treatments applied they statistically increased only in children of investigational lot TIML (Table 2).

CD-16 lymphocyte titers (natural killers) with the same levels before treatments applied, during the follow-up showed a decreasing trend, more marked in children of investigational lot TIML. Total hemolytic complement activity (THCA), which was roughly the same before treatments applied, intensified post therapy in children of both groups, but more markedly in children of group TIML (t=5.48 and p<0.001) compared to children of investigational group TTS (t=3.49 and p<0.01). An increasing trend in the content of natural antibodies was observed after therapy, it being more significant in children of lot TIML. A more convincing decrease of ESR was observed in children of group TIML (t=2.93 and p<0.01) compared with children of lot TTS after therapy (t=2.23 and p<0.05) (Table 3).

**Table 3**

Presence of some immunological markers in the blood of patients with chronic tonsillitis before and after the treatment

Indices	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
CD16 <sup>§</sup> , %	14.4±0.56	13.7±0.68	14.9±0.70	14.5±0.43
THCA (CH <sub>50</sub> ) <sup>‡</sup> , U/ml	54.3±1.26	63.5±1.10 <sup>§</sup>	50.3±0.73	54.5±0.96 <sup>†††</sup>
Natural antibodies, ln of titre	2.2±0.11	2.5±0.08	2.2±0.11	2.3±0.07 <sup>**</sup>
ERS, mm/h	6.0±0.65	3.6±0.44 <sup>§</sup>	8.1±0.88	5.5±0.79 <sup>†††</sup>

Note: \* - lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † - lot with standard therapeutic treatment; § - differentiation cluster, present on natural killers' surface; ‡ - total hemolytic complement activity; \*\* - statistically significant between study groups, after the treatment; § - statistically significant in group TIML, series before and after the treatment; †† - statistically significant in group TTS, series before and after the treatment.

The content of eosinophils decreased veridically after treatment only in children of lot TIML (t=3.16 and p<0.01).



imună „ANACombi”, după tratamentele aplicate și-a diminuat valorile.

Totuși, la copiii lotului TTS, nivelul lui a rămas mai înalt decât în lotul TIML ( $t=2,42$ ;  $p<0,05$ ), Tabelul 4.

**Tabelul 4**

Unii indicatori ai reacțiilor alergice și autoimune în loturile cercetate până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după trata- ment	până la tratament	după trata- ment
Eozinofile, %	1,9±0,24	1,0±0,10 <sup>§</sup>	2,5±0,42	2,0±0,25**
Bazofile, %	0,3±0,10	0,5±0,13	0,5±0,11	0,4±0,11
IgE (UI/ml)	34±5,7	16±2,3 <sup>§</sup>	66±22,3	35±8,5**
CD4/CD8 <sup>§</sup> , u.c.	2,1±0,05	2,0±0,03	2,2±0,19	2,1±0,07
ANACombi <sup>†</sup> , u.c.	1,0±0,05	0,8±0,04 <sup>§</sup>	1,1±0,06	0,9±0,05***

Notă: \* – lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † – lot tratament terapeutic standardizat; § – cluster de diferențiere (raportul T-helper / T-supresori); ‡ – anticorpi antinucleari; \*\* – semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § – semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament; †† – semnificație statistică în lotul TTS, seriile până și după tratament.

Nivelurile scăzute ale indicatorilor specifici pentru amigdalita cronică compensată (ASL-O, PCR și FR), în cadrul tratamentelor, au avut o tendință de descreștere în ambele loturi.

Până la tratament, sensibilizarea celulară specifică la antigenele bacteriene (streptococ, stafilococ, pneumococ) și micobacteriene a avut niveluri aproape identice în ambele loturi; după tratament, scăderea lor semnificativă s-a constatat doar în lotul TIML (Tabelul 5).

**Tabelul 5**

Sensibilizarea limfocitelor T la antigene bacteriene și micobacteriene până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după trata- ment	până la tratament	după trata- ment
TTBL <sup>§</sup> -streptococ, %	2,6±0,32	1,5±0,26 <sup>§</sup>	3,0±0,33	2,5±0,31**
TTBL-stafilococ, %	2,2±0,24	1,4±0,21 <sup>§</sup>	2,5±0,19	2,2±0,19**
TTBL-pneumococ, %	0,9±0,14	0,4±0,09 <sup>§</sup>	1,1±0,17	0,8±0,13**
TTBL-tuberculină, %	2,3±0,19	1,5±0,19 <sup>§</sup>	2,4±0,22	2,0±0,26

Notă: \* – lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † – lot tratament terapeutic standardizat; § – test de transformare blastică a limfocitelor; \*\* – semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § – semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament.

Conținutul total al limfocitelor în ambele loturi de copii până la tratament aveau aproximativ aceleași niveluri. În dinamica tratamentelor aplicate, conținutul total limfocitar s-a majorat la copiii din ambele loturi, mai pronunțată fiind majorarea acestui indicator la copiii lotului TIML. La fel, activitatea funcțională a limfocitelor (RTBL+PHA) a avut aproximativ aceleași niveluri până la tratament la copiii ambelor loturi. După tratament, în lotul TIML acest indicator a crescut sem-

while in children of lot TTS the content of eosinophils continued to remain at a high level. The content of basophils did not change, having the same levels even after treatments applied, IgE content after treatment decreased veridically in children of group TIML ( $t=2.98$  and  $p<0.01$ ). Immunoregulatory index CD4/CD8 during follow-up treatment was with no authentic distinctions. Results of ANACombi tests decreased their levels during follow-up treatments. However, this level was higher in children of group TTS compared to the level of group TIML ( $t=2.42$  and  $p<0.05$ ) (Table 4).

**Table 4**

Some indices of allergic and autoimmune reactions in groups investigated before and after treatment

Indices	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
Eosinophils, %	1.9±0.24	1.0±0.10 <sup>§</sup>	2.5±0.42	2.0±0.25**
Basophils, %	0.3±0.10	0.5±0.13	0.5±0.11	0.4±0.11
IgE (UI/ml)	34±5.7	16±2.3 <sup>§</sup>	66±22.3	35±8.5**
CD4/CD8 <sup>§</sup> , c.u.	2.1±0.05	2.0±0.03	2.2±0.19	2.1±0.07
ANACombi <sup>†</sup> , c.u.	1.0±0.05	0.8±0.04 <sup>§</sup>	1.1±0.06	0.9±0.05***

Note: \* – lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † – lot with standard therapeutic treatment; § – differentiation cluster (T-helper / T-suppressors ratio); ‡ – antinuclear antibodies; \*\* – statistically significant between study groups, after the treatment; § – statistically significant in group TIML, series before and after the treatment; †† – statistic meaning in group TTS, series before and after the treatment.

Low levels of specific indices for compensated chronic tonsillitis such as ASL-O, PCR and FR during follow-up treatment continued a downward trend in both groups of children.

**Table 5**

T-lymphocyte sensitization to bacterial and mycobacterial antigens in lots investigated before and after treatment

Indices	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
LBTT <sup>§</sup> -streptococcus, %	2.6±0.32	1.5±0.26 <sup>§</sup>	3.0±0.33	2.5±0.31**
LBTT-staphylococcus, %	2.2±0.24	1.4±0.21 <sup>§</sup>	2.5±0.19	2.2±0.19**
LBTT-pneumococcus, %	0.9±0.14	0.4±0.09 <sup>§</sup>	1.1±0.17	0.8±0.13**
LBTT-tuberculin, %	2.3±0.19	1.5±0.19 <sup>§</sup>	2.4±0.22	2.0±0.26

Note: \* – lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † – lot with standard therapeutic treatment; § – lymphocyte blast transformation test; \*\* – statistically significant between study groups, after the treatment; § – statistically significant in group TIML, series before and after the treatment.

Specific cellular sensitization to bacterial and mycobacterial antigens (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pneumococcus*) had almost identical levels before treatment in both groups of children. During follow-up treatment high levels of T-cell sen-

nificativ ( $t=3,7$ ;  $p<0,001$ ), iar în lotul TTS s-a observat doar o tendință de creștere a activității funcționale a limfocitelor T. Subpopulațiile limfocitare T (CD3) au avut niveluri similare între loturi până la tratament, și au crescut semnificativ după tratament doar în lotul TIML ( $t=2,8$ ;  $p<0,01$ ); în cadrul lotului dat s-a observat și o micșorare a conținutului subpopulațiilor de T helperi (CD4) și de T supresoare (CD8), Tabelul 6.

Conținutul total al limfocitelor B (CD20), identice până la tratament, s-a micșorat apoi doar în lotul TIML ( $t=2,85$ ;  $p<0,01$ ). La copiii din lotul TTS, conținutul limfocitelor B a prezentat o tendință de creștere mai evidentă decât în lotul TIML ( $t=4,3$ ;  $p<0,001$ ). Titrurile de IgG s-au micșorat semnificativ după tratament doar la copiii lotului TIML ( $t=2,23$ ;  $p<0,05$ ). Nivelurile de IgA și de IgM au fost similare între loturi atât înainte, cât și după tratament (Tabelul 6).

**Tabelul 6**

Indicatori cantitativi și funcționali ai limfocitelor T și B în loturile studiate până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după trata- ment	până la tratament	după trata- ment
Limfocite, %	34,8±0,89	40,6±0,90 <sup>§</sup>	32,1±0,67	35,4±0,61 <sup>††</sup>
TTBL+PHA <sup>§</sup> , %	66,4±0,75	70,4±0,79 <sup>§</sup>	68,3±1,14	69,4±0,83
CD3 <sup>‡</sup> , %	65,8±0,92	69,4±0,87 <sup>§</sup>	68,6±1,28	69,1±0,85
CD4 <sup>  </sup> , %	42,7±0,49	41,2±0,48 <sup>§</sup>	44,5±1,32	43,4±0,97
CD8 <sup>¶</sup> , %	20,8±0,38	20,2±0,16 <sup>§</sup>	21,2±1,03	21,4±0,53 <sup>**</sup>
CD20 <sup>#</sup> , %	9,5±0,55	7,6±0,40 <sup>§</sup>	9,4±0,63	9,8±0,33 <sup>**</sup>
IgG, g/l	13,5±0,88	11,2±0,52 <sup>§</sup>	15,4±0,96	14,2±0,56 <sup>**</sup>

Notă: \* – lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † – lot tratament terapeutic standardizat; § – test de transformare blastică a limfocitelor cu fitohemaglutinină; ‡ – limfocite T; || – T-helperi; ¶ – T-supresoare; # – limfocite B; \*\* – semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § – semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament; †† – semnificație statistică în lotul TTS, seriile până și după tratament.

Diferențele dintre nivelele citokinei proinflamatoare TNF- $\alpha$  au fost ne semnificative între loturi până la tratament; post terapeutic au scăzut semnificativ numai la copiii lotului TIML ( $t=2,45$ ;  $p<0,05$ ), Tabelul 7.

O dinamică asemănătoare a demonstrat-o și IL-8. Cu nivele similare în ambele loturi până la tratament, după, concentrația de IL-8 a descrescut semnificativ doar la copiii lotului TIML ( $t=2,74$ ;  $p<0,01$ ). La copiii lotului TTS (ca și în cazul TNF- $\alpha$ ), IL-8 a evoluat cu o diminuare ne semnificativă a concentrației, aceasta rămânând mai înaltă față de lotul TIML ( $t=2,19$ ;  $p<0,05$ ), Tabelul 7.

Concentrația unei alte citokine proinflamatoare – IL-1 $\beta$ , de asemenea, nu a prezentat diferențe semnificative între loturi până la tratament. Ulterior, aceasta a scăzut semnificativ doar în lotul TIML ( $t=2,15$ ;  $p<0,05$ ); la copiii lotului TTS aceasta, din contră a avut o tendință de creștere, dar statistic ne semnificativă.

sitization to antigens of streptococcus, staphylococcus, pneumococcus and Mycobacterium tuberculosis (MBT) decreased veridically only in children of group TIML (Table 5).

The total content of lymphocytes in both groups of children before treatment had approximately the same levels. During follow-up treatments, the total content of lymphocytes increased in children of both investigational groups, the increase of this index being more pronounced in children of lot TIML. In addition, functional activity of lymphocytes (RTBL+PHA) had approximately the same levels before treatment in children of both groups. After treatment, in children of lot TIML these indices increased conclusively ( $t=3.7$  and  $p<0.001$ ), in children of lot TTS there was observed only an increasing tendency of the functional activity of T lymphocytes. Subpopulations of T lymphocytes (CD3) had approximately equal levels in children of groups TIML and TTS before treatment, and increased veridically only during the follow-up complex treatment applied to children of group TIML ( $t=2.8$  and  $p<0.01$ ). There was also observed a decrease in the content of T-helper (CD4) and T suppressor (CD8) subpopulations in children of group TIML (Table 6).

**Table 6**

Quantitative and functional indices of T and B lymphocytes in lots investigated before and after treatment

Indices	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
Lymphocytes, %	34.8±0.89	40.6±0.90 <sup>§</sup>	32.1±0.67	35.4±0.61 <sup>††</sup>
LBTT+PHA <sup>§</sup> , %	66.4±0.75	70.4±0.79 <sup>§</sup>	68.3±1.14	69.4±0.83
CD3 <sup>‡</sup> , %	65.8±0.92	69.4±0.87 <sup>§</sup>	68.6±1.28	69.1±0.85
CD4 <sup>  </sup> , %	42.7±0.49	41.2±0.48 <sup>§</sup>	44.5±1.32	43.4±0.97
CD8 <sup>¶</sup> , %	20.8±0.38	20.2±0.16 <sup>§</sup>	21.2±1.03	21.4±0.53 <sup>**</sup>
CD20 <sup>#</sup> , %	9.5±0.55	7.6±0.40 <sup>§</sup>	9.4±0.63	9.8±0.33 <sup>**</sup>
IgG, g/l	13.5±0.88	11.2±0.52 <sup>§</sup>	15.4±0.96	14.2±0.56 <sup>**</sup>

Note: \* – lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † – lot with standard therapeutic treatment; § – lymphocyte blast transformation test with phytohaemagglutinin; ‡ – T lymphocytes; || – T-helperi; ¶ – T-suppressors; # – B lymphocytes; \*\* – statistically significant between study groups, after the treatment; § – statistically significant in group TIML, series before and after the treatment; †† – statistically significant in group TTS, series before and after the treatment.

The total content of B lymphocytes (CD20) with approximately the same levels in both study groups before the treatments applied, decreased after therapy only in children of group TIML ( $t=2.85$  and  $p<0.01$ ). In children of lot TTS the content of B lymphocytes after therapy showed an increasing tendency and was higher than the value quota of this index in study group TIML ( $t=4.3$  and  $p<0.001$ ). IgG titers decreased genuinely after therapy only in children of study group TIML ( $t=2.23$  and  $p<0.05$ ). IgA and IgM levels before and after the treatments applied did not differ in both groups of research (Table 6).



**Tabelul 7**

Concentrațiile serice până și după tratament ale unor citokine în loturile studiate

Parametrii	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n= 22)	
	Până la tratament	După tratament	Până la tratament	După tratament
TNF-α (pg/ml)	1,8±0,23	1,2±0,13 <sup>§</sup>	1,9±0,26	1,4±0,17
IL-8 (pg/ml)	114,0±22,6	46,0±10,0 <sup>§</sup>	138,0±32,6	107,0±25,7**
IL-1β (pg/ml)	140,0±38,7	51,0±14,6 <sup>§</sup>	152,0±40,5	198,0±28,5
IL-4 (pg/ml)	12,2±1,93	22,8±1,85 <sup>§</sup>	10,9±1,89	16,5±1,93 <sup>†††</sup>

Notă: \* – lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † – lot tratament terapeutic standardizat; \*\* – semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § – semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament; †† – semnificație statistică în lotul TTS, seriile până și după tratament.

Citokina antiinflamatoare IL-4 a avut niveluri aproape identice în loturile de studiu până la tratament. După tratament, concentrațiile IL-4 au crescut semnificativ în ambele loturi (lotul TIML,  $t=3,96$ ;  $p<0,001$  și, respectiv, lotul TTS,  $t=2,1$ ;  $p<0,05$ ). Comparând, între loturi, concentrațiile de IL-4 după tratament, acestea au fost semnificativ mai înalte în grupul TIML ( $t=2,38$ ;  $p<0,05$ ).

Indexul leucocitar al imunoreactivității (ILR), în dinamica tratamentelor aplicate, s-a majorat mai pronunțat la copiii lotului TIML ( $t=4,45$ ;  $p<0,001$ ), comparativ cu lotul TTS ( $t=2,74$ ;  $p<0,01$ ). Indexul de adaptare (IA), ca și ILR, a crescut în ambele loturi de copii în timpul tratamentelor, însă în lotul TIML, el a prezentat un grad mai înalt de autenticitate ( $t=4,4$ ;  $p<0,001$ ), comparativ cu lotul TTS ( $p<0,01$ ;  $t=3,5$ ), Tabelul 8.

**Tabelul 8**

Indicatorii reactivității imune în loturile investigate până și după tratament

Parametri	Lot TIML* (n=22)		Lot TTS† (n=22)	
	până la tratament	după tratament	până la tratament	după tratament
ILR <sup>‡</sup> , u.c.	0,59±0,022	0,74±0,024 <sup>§</sup>	0,54±0,018	0,61±0,016 <sup>†††</sup>
IA <sup>#</sup> , u.c.	0,60±0,025	0,76±0,026 <sup>§</sup>	0,54±0,017	0,62±0,017 <sup>†††</sup>

Notă: \* – lot terapie imunomodulatorie locală, cu celule mononucleate autologe; † – lot tratament terapeutic standardizat; ‡ – indexul leucocitar al imunoreactivității; # – indexul de adaptare; § – semnificație statistică dintre loturi, după tratament; § – semnificație statistică în lotul TIML, seriile până și după tratament; †† – semnificație statistică în lotul TTS, seriile până și după tratament.

Pacienții care au beneficiat de imunostimulare locală cu celule mononucleate autologe, au avut dinamică clinică pozitivă în catamneză în 92% din cazuri. Ea s-a caracterizat prin micșorarea vădită a numărului de infecții acute ale căilor respiratorii superioare, micșorarea în volum a amigdalelor palatine și lipsa maselor cazeoase în lacunele amigdalene. La copiii tratați tradițional, eficiență clinică s-a înregistrat în 80% din cazuri.

**Table 7**

Cytokines concentrations before and after the treatment

Indices	Lot of study TIML* (n=22)		Lot of study TTS† (n= 22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
TNF-α (pg/ml)	1.8±0.23	1.2±0.13 <sup>§</sup>	1.9±0.26	1.4±0.17
IL-8 (pg/ml)	114.0±22.6	46.0±10.0 <sup>§</sup>	138.0±32.6	107.0±25.7**
IL-1β (pg/ml)	140.0±38.7	51.0±14.6 <sup>§</sup>	152.0±40.5	198.0±28.5
IL-4 (pg/ml)	12.2±1.93	22.8±1.85 <sup>§</sup>	10.9±1.89	16.5±1.93 <sup>†††</sup>

Note: \* – lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † – lot with standard therapeutic treatment; \*\* – statistically significant between study groups, after the treatment; § – statistically significant in group TIML, series before and after the treatment; †† – statistically significant in group TTS, series before and after the treatment.

Without conclusive differences in the study groups until treatment, post-therapeutic levels of TNF-α proinflammatory cytokine decreased only in the TIML study group of the children ( $t=2.45$  and  $p<0.05$ ). For the TTS investigational group of children were characteristic only diminishing trends of this proinflammatory cytokine levels (Table 7).

A similar therapeutic trend has demonstrated by IL-8. Without reliable differences of levels between the study groups to treatment, IL-8 decreased conclusive only in children study group TIML ( $t=2.74$  and  $p<0.01$ ). In the TTS study group of children (as in the case of TNF-α). IL-8 has developed to a non-significant decrease of its concentration, it continues to remain higher than in children study group TIML ( $t=2.19$  and  $p<0.05$ ) (Table 7).

The content of other proinflammatory cytokines – IL-1β, decreased only in children conclusive study group TIML without significant differences in the study groups before and after treatments have been applied ( $t=2.15$  and  $p<0.05$ ), but at the children in group TTS, IL-1β has continued to grow even though was not statistically confirmed.

**Table 8**

Indicators of immune reactivity in study groups before and after treatment

Parameters	TIML group* (n=22)		TTS group† (n=22)	
	before treatment	after treatment	before treatment	after treatment
LIR <sup>‡</sup> , u.c.	0.59±0.022	0.74±0.024 <sup>§</sup>	0.54±0.018	0.61±0.016 <sup>†††</sup>
IA <sup>#</sup> , u.c.	0.60±0.025	0.76±0.026 <sup>§</sup>	0.54±0.017	0.62±0.017 <sup>†††</sup>

Note: \* – lot with local immunomodulatory therapy, with autologous mononuclear cells; † – lot with standard therapeutic treatment; ‡ – leukocyte index of immunoreactivity; # – index of adaptation; § – statistically significant between study groups, after the treatment; § – statistically significant in group TIML, series before and after the treatment; †† – statistically significant in group TTS, series before and after the treatment.

Antiinflammatory cytokine IL-4 had nearly identical levels in the study groups to treatment. After treatment IL-4 levels increased significantly in both groups (group TIML:  $t=3.96$

În timpul tratamentului local imunomodulator cu celule mononucleate autologe la copiii cu amigdalită cronică compensată nu au fost înregistrate reacții adverse sau complicații.

### Discuții

Se cunosc diverse variante de terapie cu celule mononucleate autologe, însă, până în prezent, nu există un consens referitor la riscurile și beneficiile tratamentelor date [17].

Efecte benefice ale administrării celulelor mononucleate autologe au fost comunicate de către Friptu V. și coaut. (2004) în cadrul tratamentului salpingooforitelor cronice; în cazurile date au fost constatate: normalizarea (scăderea) numărului de leucocite, majorarea numărului de limfocite și normalizarea titrului de celule imunocompetente în sângele periferic. Mai puțin expresive au fost acțiunile terapiei imunomodulatoare asupra imunității umorale [18].

Gladun E. și coaut. (2004), au opinat oportunitatea aplicării celulelor mononucleate autologe la pacientele beneficiare de operații cezariene. La marea majoritate a pacientelor, după terapia cu celule mononucleate autologe, s-a normalizat numărul de leucocite, limfocite și celule imunoreglatoare, au scăzut nivelurile CIC și s-au ameliorat indicatorii fagocitozei. De asemenea, s-a micșorat concentrația plasmatică de proteină C-reactivă, s-a normalizat activitatea lizocimului [19].

Conform datelor obținute în studiul nostru, la copiii cu amigdalită cronică compensată sunt prezente manifestări ale deplasării formulei leucocitare spre stânga, care determină o dinamică lentă de reducere a intoxicației tonsilogene în cazul tratamentelor convenționale. Explicația rezidă în faptul că fagocitele (monocitele, macrofagele și neutrofilele) din organismului acestor copii asigură un clearanciu redus al complexelor imune. Descreșterea valorilor tuturor celor 3 indicatori, care reflectă capacitatea de fagocitare (testul NBT, numărul fagocitar și indexul fagocitar), explică cauza eliminării lente a complexelor imune circulante la bolnavii lotului TTS și, prin urmare, a diminuării mai lente a intoxicației tonsilogene la acești copii.

Asocierea terapiei locale cu celule mononucleate autologe la tratamentul standard al amigdalitei cronice compensate a condus la ameliorarea componentelor formulei leucocitare și a unui șir de indicatori imuni și preimuni.

Sub acțiunea terapiei locale cu celule mononucleate autologe, care sunt aplicate în tratamentul complex a amigdalitei cronice la copii, parametrii care caracterizează starea rezistenței preimune a organismului – cantitatea de CD16, a anticorpilor normali, dinamica activității hemolitice totale a complementului și a VSH, au fost supuși unui proces de normalizare mai eficient, comparativ cu efectele tratamentului convențional.

Aplicarea terapiei cu celule mononucleate autologe în complex cu metodele convenționale de tratament, au contribuit mai eficient la scăderea valorilor crescute ale parametrilor care reflectă sensibilizarea și autoimunizarea organismului (numărul de eozinofile, concentrația de IgE, de ANAcombi etc.).

De asemenea, tratamentul cu celule mononucleate autologe a amigdalitei cronice a indus o desensibilizare mai pronun-

and  $p < 0.001$ ; and group TTS:  $t = 2.1$  and  $p < 0.05$ ). As a result, the titer of the post-therapy antiinflammatory cytokine was significantly increased in children of the first study group compared to the IL-4 levels in children group TTS after the treatment ( $t = 2.38$  and  $p < 0.05$ ).

Leukocyte immunoreactivity index (LIRI) during follow-up treatments, increased more pronouncedly in children of study group TIML ( $t = 4.45$  and  $p < 0.001$ ) compared with group TTS ( $t = 2.74$  and  $p < 0.01$ ). Adaptation index (AI), as for LIRI increased in both groups of children, but in study group TIML the values of this index showed a higher degree of authenticity ( $t = 4.4$  and  $p < 0.001$ ) compared to investigational group TTS ( $t = 3.5$  and  $p < 0.01$ ) (Table 8).

A positive clinical dynamics in catamnesis was appreciated in 92% of cases in patients in the TIML group, who were applied local immunostimulation in the complex treatment with autologous mononuclear cells. It was characterized by lack of acute upper respiratory tract infections, decrease of the palatine tonsils in volume and lack of caseous masses in tonsillar holes. The treatment had a positive clinical effect in 80% of cases in children in group TTS, treated by traditional method.

Following local immunomodulatory treatment with autologous mononuclear cells, children with compensated chronic tonsillitis did not present any side effects or complications.

### Discussions

Different versions of autologous mononuclear cell therapy are known. However, there is still no consensus on the benefits and potential harm of autologous mononuclear cell therapy [17].

The beneficial effects of autologous mononuclear cell administration were demonstrated by Friptu V. and coauthors (2004) in the treatment of chronic salpingo-oophoritis, after autologous mononuclear cell therapy, there being recorded the normalization (decrease) of leukocyte number, lymphocyte content increase and normalization of immunocompetent cell titer in peripheral blood. The levels of normalization of humoral immunity were less significant [18].

Gladun E. and coauthors (2004) have stressed the opportunity of autologous mononuclear cell application in patients undergoing caesarean sections. The content of leukocytes, lymphocytes and immunoregulatory cells normalized after autologous mononuclear cell therapy in the vast majority of patients, while the levels of CIC reduced and phagocytic indices improved. In addition, the content of C-reactive protein decreased, lysozyme activity normalized [19].

According to research data obtained, children with compensated chronic tonsillitis manifest the leukocyte formula movement to "left" and slow normalization of its components, respectively leading to slower decrease of tonsilogenic intoxication after conventional treatments. This is explained by the slow phagocytes (monocytes, macrophages and neutrophils) elimination of immune complexes. The decrease in all 3 indices reflecting phagocytic ability (NBT test, phagocytic number and index) in patients of lot TTS accounts for the cause of slow elimination of circulating immune complexes in children with

țată a celulelor imune la antigenele streptococului, stafilococului, pneumococului, micobacteriei tuberculozei, ceea ce nu s-a observat în cazul tratamentelor convenționale.

Feofanova T. (2004) a aplicat o metodă de tratament a afecțiunilor alergice cu utilizarea limfocitelor proprii din sângele venos al bolnavului. Acestea, după ce trec o procedură de „purificate” prealabilă de antigenele și receptorii de suprafață, cu afinitate scăzută, sunt reintroduse secvențial pacientului. Receptorii de suprafață, cu afinitate înaltă față de alergeni, în procesul de prelucrare rămân intacti. Datele obținute au confirmat, de asemenea, că administrarea limfocitelor proprii reduce nivelele de IgE la pacienții alergici [20].

Includerea terapiei cu celule mononucleate autologe în tratamentul complex al amigdalitei cronice compensate, a eficientizat procesul de normalizare a indicatorilor modificați ai limfocitelor T: majorarea numărului total al limfocitelor, creșterea nivelurilor și activității funcționale a limfocitelor T, precum și normalizarea indexului CD4/CD8. Aplicarea terapiei cu celule mononucleate autologe a demonstrat o contribuție mai eficientă în normalizarea indicatorilor cantitativi și calitativi modificați ai limfocitelor B și de IgG, prin scăderea conținutului lor total. Datele obținute sunt similare cu rezultatele cercetărilor lui Sandul Al. (1996), care a utilizat celule mononucleate autologe în tratamentul afecțiunilor purulente ale urechii medii. După sanarea focarului de infecție și aplicarea locală a autocelulelor, în imunitatea generală avea loc majorarea numărului limfocitelor T și scăderea celui de limfocite B, precum și normalizarea nivelurilor de imunoglobuline [21-22].

De asemenea, Șavga G. și coaut. (2004), au aplicat celule mononucleate autologe activate în calitate de terapie imună locală în spondiloartrite la copii. Autorii au demonstrat normalizarea funcției imune din contul majorării nivelurilor de proliferare și diferențiere a limfocitelor T-supresoare, diminuarea activității limfocitelor T-helper, scăderea nivelurilor de proliferare a limfocitelor B și producției de anticorpi [23].

Terapia cu celule mononucleate autologice, aplicată odată cu metoda standard de tratament, asigură efecte benefice asupra profilului citokinic al copiilor cu amigdalită cronică compensată, diminuând nivelele citokinelor proinflamatoare (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ) și crescând concentrațiile serice ale citokinelor antiinflamatoare (IL-4).

Majorarea indicatorilor ILR (unul din indicatorii care permit evaluarea rapidă a stării reactivității imune) și IA (index, care reflectă starea capacității adaptogene a organismului) la copiii cu amigdalită cronică compensată, în urma tratamentului complex cu imunostimulare locală, confirmă dinamica pozitivă a statutului imun general la acești pacienți.

### Concluzii

Terapia locală cu celule mononucleate autologe exercită o acțiune complexă asupra caracterului modificărilor stării rezistenței preimune și reactivității imune. Ea asigură o normalizare mai eficientă a parametrilor modificați în amigdalita cronică compensată la copii, care corespunde unui efect clinic pozitiv în 92% din cazuri.

compensated chronic tonsillitis and therefore a slower decrease in levels of tonsilogenic intoxication in these children.

The involvement of local therapy with autologous mononuclear cells to standard treatment of compensated chronic tonsillitis resulted in improvement of leukocyte formula components as well as other immune and pre-immune indices.

Under the action of local therapy with autologous mononuclear cells, which are applied in the complex treatment of chronic tonsillitis in children, indices that characterize the pre-immune resistance of the organism – the content of CD16, normal antibodies, dynamics of total hemolytic complement activity and ESR were more efficiently subjected to normalization compared with the effects of standard treatment.

Application of autologous mononuclear cell therapy in complex with standard methods of treatment have contributed more effectively to decrease of high indices of allergic and autoimmune reactions – content of eosinophils, IgE, ANA-combi, compared only with standard treatment.

Administration of autologous mononuclear cell therapy to children with compensated chronic tonsillitis had a more pronounced desensitizing action on specific cellular sensitization in streptococcus, staphylococcus, pneumococcus, and MBT antigens, which is not observed in children treated only with standard therapy alone.

While treating allergic diseases, Feofanova T. (2004) used patient's own venous blood lymphocytes, which consists in sequential introduction of immunocompetent cells priorly "purified" through certain techniques off surface antigens and receptors with low affinity responsible for their physiological metabolism. In this case, surface receptors with high affinity for cell membranes responsible for allergic reactions remain intact during processing. The data obtained also confirmed the decrease of IgE levels in allergic patients after applying autolymphocytes [20].

Inclusion of autologous mononuclear cell therapy in the complex treatment of compensated chronic tonsillitis ensured the normalization of modified indices of T lymphocytes – increase of the total content of lymphocytes, increase of levels and functional activity of T lymphocytes as well as normalization of CD4/CD8 correlation. Application of autologous mononuclear cell therapy demonstrated to have a more efficient contribution and normalization of modified quantitative and qualitative indices of B lymphocytes and IgG, resulting in decreased total content of B and IgG lymphocytes. These data are similar to the research results obtained by Sandul Al. (1996), who used autologous mononuclear cells in the treatment of purulent diseases of the middle ear. After removal of infection focus and local application of autologous cells, there was an increase in T- lymphocyte content in general immunity and decrease of B lymphocyte content, as well as normalization of the levels of immunoglobulins [21-22].

Also, Șavga G. and colleagues (2004), applied activated autologous mononuclear cells as local immune therapy in spondyloarthritis in children and showed that this leads to normalization of immune function due to increase of levels of proliferation and differentiation of suppressor T lymphocytes,

### Conflict de interese

Autorii declară lipsa conflictelor de interese financiare sau nonfinanciare.

### Contribuția autorilor

IA, SG, LD, VN și MM au conceput studiul, au elaborat design-ul cercetării, au asigurat colectarea materialului clinic, au efectuat analiza statistică a datelor și au contribuit la redactarea manuscrisului.

decrease of T-helper lymphocyte activity, decreased levels of B lymphocyte proliferation and antibody production [23].

Autologous mononuclear cells therapy applied with the standard method of treatment will provide beneficial effects of the cytokine profile of children with compensated chronic tonsillitis. which reduce levels of proinflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ ) and increase serum levels of inflammatory cytokines (IL-4).

Increasing levels of LIRI (one of indices that allows rapid assessment of the immune reactivity state) and IA indices (index that reflects the state of body adaptogenic capacity) in children with compensated chronic tonsillitis after complex treatment with local immunostimulation confirms once again the positive dynamics of the general immune status in these patients.

### Conclusions

Local therapy with autologous mononuclear cells has a complex action on the changes of preimmune resistance state and immune reactivity and leads to effective normalization of changed indices in compensated chronic tonsillitis in children. which corresponds to a high positive clinical effect (92%).

### Conflict of interests

The authors declare no financial or nonfinancial conflict of interests.

### Authors' contribution

IA, SG, LD, VN and MM conceived the study and participated in the development of the design research and collection of clinical material. statistically analyzed the data, contributing to manuscript editing.

### Referințe / references

- Jovic M., Avramovic V., Vlahovic P., Savic V., Velickov A., Petrovic V. Ultrastructure of the humen palatine tonsil and its functional significance. *Rom J Morphol Embryol*, 2015; 56(2): 374-377.
- Danilov L. Problema amigdalitei cronice în otorinolaringologie și pediatrie (sinteză de literatură). *Buletin de perinatologie*, 2013; 2(58) – 3(59): 143-148.
- Mera S., Tatulescu D., Cismaru C., Bondor C., Slavcovici A., Zanc V., Carstina D., Oltean M. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS*, 2010; 119: 155–163.
- Hagau N., Slavcovici A., Gongnanau D., Oltean S., Dirzu D., Brezozski E. *et al.* Clinical aspects and cytokine response in severe H1N1 influenza A virus infection. *Crit. Care*, 2010; 14(6): 203.
- Bermejo-Martin J., Garcia-Arevalo M., De Lejarazu R., Ardura J., Eiros J., Alonso A. *et al.* Predominance of Th2 cytokines, CXC chemokines and innate immunity mediators at the mucosal level during severe respiratory syncytial virus infection in children. *Eur. Cytokine Netw.*, 2007; 18(3): 162-167.
- Bermejo-Martin J., De Lejarazu R., Pumarola T., Rello J. *et al.* Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*, 2009; 13(6): 201.
- Nacu V., Danilov L., Tagadiuc O., Nacu L., Fulga V. Cemortan I., Capcelea S. Unele aspecte de activizare a procesului de regenerare prin culturi celulare. *Anale științifice ale Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*, Chișinău, 2005; 4: 112-117.
- Ababii I., Popa V. Otorinolaringologie (pentru medici de familie). Chișinău, 2002; p. 94-95.
- Гинда С. Модификация микрометода реакции бласттрансформации лимфоцитов. *Лабораторное дело*, 1982; (8): 23-25. [Ginda S. Modifikacija mikrometoda reakcii blasttransformacii limfocitov. *Laboratornoe delo*, 1982; (8): 23-25].
- Павлович С. А. Основы иммунологии. Минск. Высшэйшая школа, 1998; 114 с. [Pavlovich S. A. Osnovy immunologii. Minsk. Vyshejschaja shkola. 1998; 114]
- Park B. *et al.* Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. *The Lancet*, 1968; 11 (7567): 532-534.
- Гриневиц Ю. А., Каменец Л. Я. Основы клинической иммунологии опухолей. Киев. Здоровья, 1986; 158 с. [Grinevich Ju. A., Kamenech L. Ja. Osnovy klinicheskoy immunologii opuholej. Kiev. Zdorovja, 1986; 158 p.].
- Ghinda S., Sofronie S., Chiroșca V., Privalova E., Calenda O., Smeșnoi V., Lesnic E., Barbuța A., Rotaru N., Iaconi L. Metodă concomitentă de determinare a CIC cu masa moleculară joasă, medie și înaltă. Certificat de inovator. Înregistrat la institutul de Ftiziopneumologie al Republicii Moldova cu nr. 46. la data de 12.05.2008.
- Ghinda S., Brumari A., Donica A., Iaschina V., Chirița A. Metodă de determinare a stării reactivității imunologice a organismului.



- Certificat de inovator. Înregistrat la Institutul Mamei și Copilului cu nr. 398 din 10.11.1996.
15. Ghinda S., Frunze N., Chiroșca V., Brumari A., Chirița A., Iaschi-na V., Donica A. Metodă de determinare a reacțiilor de adaptare a organismului după formula leucocitară. Certificat de inovator. Înregistrat cu nr. 3 la data de 20.11.1997 la Institutul de Ftizio-pneumologie al Republicii Moldova.
  16. Резникова Л.С. Комплемент и его значение в иммунологических реакциях. Москва, Медицина, 1967; 272 с. [Reznikova L. S. Komplement i ego znachenie v immunologicheskikh reakcijah. Moskva. Medicina, 1967; 272 p.]
  17. Posiseyeva L. V. Lymphocyte immunotherapy: pros and cons. *Akusherstvo i ginekologija*. 2010; 2: 11-14.
  18. Friptu V., Cușnir G., Marian-Pavlenco A. Imunoterapia bolii inflamatorii pelvine (p. 202-226). În: Stimularea imunității locale în tratamentul procesului inflamator. Editori: Ababii I., Șroit I., Gladun E., Ghidirim Gh., Chișinău, 2004; 333 p.
  19. Gladun E., Opalco I., Camâș E. Stimularea imunității locale în operația cezariană (p. 168-201). În: Stimularea imunității locale în tratamentul procesului inflamator. Editori: Ababii I., Șroit I., Gladun E., Ghidirim Gh., Chișinău, 2004; 333 p.
  20. Feofanova T., Logina N., Serov T., Ershov I., Alenteva S. Retro controlled study of the effect of lymphocyte immunotherapy on the dynamics of total IgE level in allergy patients. *Dni imunologii v SPb* 2004. Tez. dokl. *Medicinskaja immunologija*, 2004; 6(3-5): 276-277.
  21. Sandul A. Mastoidoplastia cu autoos spongios combinată cu imunocorecție pentru tratamentul bolnavilor cu otite medii cronice supurate. Teză de doctor habilitat în științe medicale. Chișinău, 1996; p. 158-169.
  22. Ababii I., Sandul A., Kozliuc A. Abordări noi în tratamentul otitei medii cronice supurate (p. 146-166). În: Stimularea imunității locale în tratamentul procesului inflamator. Editori: Ababii I., Șroit I., Gladun E., Ghidirim Gh., Chișinău, R. Moldova, 2004; 333 p.
  23. Șavga G., Camâș E., Șroit I. Imunoterapia locală a spondiloartritei la copii și adolescenți (p. 286-296). În: Stimularea imunității locale în tratamentul procesului inflamator. Editori: Ababii I., Șroit I., Gladun E., Ghidirim Gh., Chișinău, R. Moldova, 2004; 333 p.