

Влияние препаратов местной антимикробной терапии на свойства клеток врожденного и адаптивного иммунитета

Ж.М. САЛМАСИ, А.Н. КАЗИМИРСКИЙ, Е.А. АНТОНОВА, Г.В. ПОРЯДИН

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации: 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Информация об авторах:

Салмаси Жан Мустафаевич – д.м.н., профессор, завкафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: +7 (495) 936-93-74; e-mail: profjms@yandex.ru

Казимирский Александр Николаевич – д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела молекулярных технологий

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: +7 (495) 936-93-74

Антонова Евгения Александровна – аспирант кафедры госпитальной педиатрии им. акад. В.А. Таболина Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени

Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: +7 (495) 936-93-74

Порядин Геннадий Васильевич – чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; тел.: +7 (495) 936-93-74

РЕЗЮМЕ

В настоящее время в клинической практике широкое распространение получили препараты местной антимикробной терапии Тантум Верде (бензидамин), Тантум Роза (бензидамин), Мирамистин (бензилдиметил-миристоиламино-пропиламмоний), Гексорал (гексэтидин), Хлоргексидин (хлоргексидин), Септолете тотал (бензидамин + цетилпиридиния хлорид). Механизм действия этих препаратов в основном заключается в разрушении клеточной оболочки микроорганизмов. Мы исследовали влияние этих препаратов на жизнеспособность клеток лимфоидной ткани и их влияние на нейтрофильное звено иммунной системы, которое является важнейшим фактором местного иммунитета и одновременно частью иммунной системы, ответственной за врожденный иммунитет.

В работе использовали периферическую кровь 6 здоровых доноров и 6 больных воспалительными заболеваниями (абсцесс брюшной полости). Оценку жизнеспособности лимфоцитов проводили в тесте с использованием трипанового синего. Функциональное состояние нейтрофилов проводили в тесте с нитросиним тетразолием. Конечная концентрация исследуемых препаратов во всех экспериментах составляла 10% от исходной, рекомендованной для местного применения. Результаты исследования показали, что Мирамистин, Гексорал, Хлоргексидин, Септолете тотал вызывают гибель лимфоцитов, полученных от здоровых доноров и пациентов с тяжелым воспалением. Тантум Верде и Тантум Роза гибель лимфоцитов не вызывают. Все исследованные препараты, кроме Тантум Верде и Тантум Роза у здоровых доноров, снижают количество нейтрофилов, содержащих гранулы формазана, что свидетельствует о подавлении активности NADPH-оксидазной системы. Нейтрофилы пациентов, активированные воспалительным процессом под влиянием Мирамистина, испытывают кратковременную избыточную активацию NADPH-оксидазной системы, которая может привести к повреждению тканей при тяжелом воспалении.

Ключевые слова: Тантум Верде, Тантум Роза, Мирамистин, Гексорал, Хлоргексидин, Септолете тотал, лимфоциты, нейтрофилы

Для цитирования: Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Антонова Е.А., Порядок Г.В. Влияние препаратов местной антимикробной терапии на свойства клеток врожденного и адаптивного иммунитета. *Медицинский совет*. 2019; 8: 76-82. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-76-82>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имеет спонсорской поддержки.

Evaluation of influence several drugs

WITH LOCAL ANTIMICROBIAL ACTIVITY AGAINST LOCAL IMMUNITY CELLS

Jean M. SALMASI, Alexander N. KAZIMIRSKY, Evgenia A. ANTONOVA, Gennady V. PORYADIN

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov of the Ministry of Health of the Russian Federation: 117997, Russia, Moscow, Ostrovityanova St., 1

Author credentials:

Salmasi Jean Mustafaeich – Dr. of Sci. (Med.), Professor, Head of Department of Pathophysiology and Clinical Patho-

physiology, the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pirogov Russian National Research Medical

University», of the Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: +7 (495) 936-93-74; e-mail: profjms@yandex.ru

Antonova Evgenia Alexandrovna – post-graduate student of the department of hospital pediatrics named after Acad. V.A. Tabolina, the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pirogov Russian National Research Medical University», of the Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: +7 (495) 936-93-74

Kazimirsky Alexander Nikolaevich – Dr. of Sci. (Bio.), Assistant Professor, Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pirogov Russian National Research Medical University», of the Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: +7 (495) 936-93-74

Poryadin Gennady Vasilievich – Corr. Member of RAS, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Pirogov Russian National Research Medical University», of the Ministry of Health of the Russian Federation; tel.: +7 (495) 936-93-74

ABSTRACT

Currently in clinical practice widely used drugs local antimicrobial drugs such as Tantum Verde (benzydamine) Tantum Rosa (benzydamine) Miramistin (benzyl-dimethyl-miristoilamino-propylammonium) Hexoral (hexetid), chlorhexidine (chlorhexidine), Septotele total (benzydamine + cetylpyridinium chloride). The mechanism of action of these very similar. We evaluated the effect of these drugs on the viability of lymphoid tissue cells and their effect on the neutrophilic part of the immune system, which are the most important factors of local immunity and, at the same time, part of the immune system which is responsible for innate immunity.

We used peripheral blood from 6 healthy donors and 6 patients with inflammatory diseases (abscess of the abdominal cavity). Evaluation of the viability of lymphocytes was performed in a test using trypan blue. The functional state of neutrophils was performed in a nitro-blue tetrazolium test. The final concentration of the studied drugs in all experiments was 10% of the initial recommended for local use.

The results of the study showed that Miramistin, Hexoral, Chlorhexidine, Septotele Total cause the death of lymphocytes isolated from healthy donors and patients with severe inflammation process. Tantum Verde and Tantum Rose do not cause the death of lymphocytes. All studied drugs (except Tantum Verde and Tantum Rose in healthy donors) reduce the number of neutrophils containing formazan granules, which indicates the suppression of the activity of the NADPH oxidase system. Patients' neutrophils were activated by inflammatory process under the influence of miramistin experiencing short-term excessive activation of the NADPH-oxidase system, which can lead to tissue damage in severe inflammation.

Keywords: *Tantum Verde, Tantum Rose, Miramistin, Hexoral, Chlorhexidine, Septotele total, lymphocytes, neutrophils*

For citing: Salmasi J.M., Kazimirsky A.N., Antonova E.A., Poryadin G.V. Evaluation of influence several drugs with local antimicrobial activity against local immunity cells. *Meditsinsky Sovet.* 2019; 8: 76-82. DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-76-82>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Препараты для местной антимикробной терапии получили широкое распространение у врачей клинических специальностей: терапевтов, педиатров, оториноларингологов, гинекологов, т. к. именно они оказывают помощь пациентам с острыми инфекционно-воспалительными заболеваниями.

Инфекционные заболевания, и в частности острые респираторные заболевания, характеризуются воспалением слизистых оболочек и вызываются вирусами, бактериями, грибами, внутриклеточными микроорганизмами. Клиническая симптоматика определяется локализацией очага воспаления. В качестве этиотропной терапии применяют группу системных и местных антибиотиков, а также препаратов с местной антимикробной активностью. В качестве патогенетической терапии используются в основном противовоспалительные препараты.

Неконтролируемое применение антибиотиков привело в последнее время к появлению антибиотикорезистентности, представляющей серьезную проблему современной медицины. Врачи обоснованно избегают назначать системные антибиотики, но при этом нагрузка на препараты для местной антимикробной терапии, соответственно, увеличивается, что требует актуализации знаний о свойствах данных препаратов.

В настоящее время в клинической практике в РФ широкое распространение получили препараты на основе бензидамина, бензилдиметил-миристоиламино-пропиламмония, гексэтидина, хлоргексидина и цетилпиридиния хлорида. Принцип местного антимикробного действия этих препаратов заключается в разрушении клеточной оболочки микроорганизмов и подавлении их метаболизма, что приводит к их конечной гибели. Однако их влияние на жизнеспособность и гибель клеток лимфоидной ткани практически не изучено. Также не выяснено их влияние на нейтрофильное звено иммунной системы, которое является важнейшим фактором местного иммунитета и одновременно частью иммунной системы, ответственной за врожденный иммунитет.

Актуальность настоящего исследования определяется недостаточной изученностью взаимодействия препаратов местной антимикробной терапии на различные клетки иммунной системы человека, что поможет в повышении безопасности, а возможно, и эффективности проводимой местной терапии.

Цель настоящего исследования состояла в определении выживаемости лимфоцитов под влиянием ряда препаратов с антисептическими свойствами, а также способности нейтрофилов к генерации радикалов кислорода у здоровых доноров и пациентов с тяжелым воспалительным заболеванием.

МЕТОДЫ

Здоровые доноры и пациенты. В работе использовали периферическую кровь 6 здоровых доноров и 6 пациентов с воспалительными заболеваниями (абсцесс брюшной полости) в острый период заболевания с высокими показателями лейкоцитоза (10–12 тыс/мкл). Больные находились на лечении в хирургическом отделении 31 ГКБ г. Москвы.

Получение клеточных фракций. В исследовании использовали клеточные фракции лимфоцитов и нейтрофилов.

Лимфоциты. Венозную кровь (10 мл) здоровых доноров и больных помещали в силиконизированную пробирку с ЭДТА для предотвращения свертывания. Для получения мононуклеарных клеток, обогащенных лимфоцитами, использовали метод градиентного центрифугирования. Кровь разводили в два раза Na-фосфатным буферным раствором 50 мМ, содержащим 0,9% NaCl, pH 7,4 и наслаивали на раствор фиколл-верографина с плотностью 1,077 г/см³. После центрифугирования (1 600 об/мин, 30 мин) эритроциты и гранулоциты проходят сквозь плотный раствор фиколла и оседают на дно, а мононуклеарные клетки крови (лимфоциты и моноциты) остаются в виде кольца в интерфазе. Клетки интерфазного кольца отбирали, дважды отмывали буферным раствором, применяя осаждение в центрифуге (1 200 об/мин, 15 мин) и использовали для экспериментов. Концентрация мононуклеарных клеток после выделения составляла 0,5 млн/мл.

Нейтрофилы. Для выделения нейтрофилов из венозной крови, обработанной ЭДТА, кровь разводили в два раза буферным раствором и наслаивали на двойной градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляет 1,077, а нижнего – 1,095. После центрифугирования (1 600 об/мин, 30 мин) на границе между градиентами появляется кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, эритроциты при этом оседают на дно пробирки. Кольцо нейтрофильных гранулоцитов отбирали, перенесли в пробирку для центрифугирования, дважды отмывали от примесей фиколла буферным раствором, используя центрифугирование для осаждения клеток (1 200 об/мин, 15 мин).

Препараты. В работе использовали коммерческие препараты Тантум Верде, Тантум Роза, Мирамистин, Гексорал, Хлоргексидин, Септолете тотал. В исследовании применялись как 100%-ные, так и 10%-ные концентрации препаратов от исходной концентрации в коммерческих препаратах.

Культивирование клеток крови с препаратами. К стерильно выделенным лимфоцитам и нейтрофилам добавляли исследуемые фармакологические препараты и проводили инкубацию их с клетками при 37 °С во всех экспериментах.

Определение проницаемости мембран лимфоцитов с использованием трипанового синего. Этот подход характеризуется надежностью и высокой воспроизводимостью,

и поэтому метод окрашивания клеток трипановым синим принят как обязательный экспресс-метод оценки жизнеспособности клеточных культур. Неповрежденные клеточные мембраны непроницаемы для трипанового синего при кратковременной инкубации. Включения красителя в цитозоле свидетельствуют о нарушении интактности клеточной мембраны. Для визуальной оценки повреждения клеток используется способность ядерных белков адсорбировать краситель. Даже самое слабое окрашивание ядра клетки указывает на повреждение клеточной мембраны. Суспензию лимфоцитов после инкубирования с препаратами смешивали с 0,5%-ным раствором трипанового синего в Na-фосфатном буферном растворе в соотношении 1:1. Клеточную суспензию переносили в камеру Горяева и вели подсчет окрашенных лимфоцитов и общего их количества. Результаты выражали в процентах как отношение окрашенных клеток к общему количеству лимфоцитов в поле зрения.

Определение функционального состояния кислород-зависимого механизма бактерицидности нейтрофилов (тест с нитросиним тетразолием, НСТ-тест). Спонтанный НСТ-тест позволяет оценить функциональное состояние нейтрофилов крови *in vitro*. Он характеризует состояние и степень активации внутриклеточной NADPH-оксидазной антибактериальной системы. Метод основан на восстановлении поглощенного нейтрофилами растворимого нитросинего тетразолия и его превращении в клетках в нерастворимый диформаза под влиянием супероксид-анион-радикала (O₂⁻). Голубые гранулы диформаза накапливаются в нейтрофилах и определяются при микроскопировании. Метод включает в себя инкубирование 0,1 мл суспензии нейтрофилов (после обработки соответствующими фармакологическими препаратами) с 0,05 мл 0,2%-ного раствора нитросинего тетразолия в Na-фосфатном буфере и 0,05 мл того же буфера. Суспензию нейтрофилов инкубировали 1 ч при 37 °С, делали мазки средней плотности, высушивали на воздухе, фиксировали в этиловом спирте (20 мин), окрашивали водным раствором нейтрального красного (0,1%, 20 мин) и микроскопировали под иммерсией. Среди 100 клеток подсчитывали долю активированных нейтрофилов, содержащих гранулы диформаза. Результаты выражали в процентах как отношение количества нейтрофилов, накопивших гранулы формаза, к общему количеству нейтрофилов в поле зрения [1, 2].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования проницаемости мембран клеток адаптивного («приобретенного») иммунитета – лимфоцитов после их инкубации с препаратами местной антимикробной терапии приведены в *таблицах 1 и 2*.

В контроле гибель лимфоцитов как у здоровых доноров, так и у пациентов с тяжелым воспалительным процессом не превышает 2% и отражает повреждение клеток в ходе процедуры их выделения из периферической крови. А инкубация лимфоцитов с исследуемыми препаратами в рабочей концентрации вызывает их гибель.

● **Таблица 1.** Влияние препаратов местной антимикробной терапии на жизнеспособность мононуклеарных клеток крови здоровых доноров (без разведения)

● **Table 1.** Effect of local antimicrobial drugs on the viability of mononuclear blood cells of healthy donors (without dilution)

Препараты	Здоровые доноры	
	М ± m (средние значения)	Достоверность отличий от контроля
Контроль (физиологический раствор)	1,53 ± 0,17	
1. Тантум Верде	4,98 ± 0,14	p < 0,05
2. Тантум Роза	6,07 ± 0,59	p < 0,05
3. Мирамистин	26,21 ± 1,56	p < 0,001
4. Гексорал	17,45 ± 0,93	p < 0,001
5. Хлоргексидин	13,52 ± 1,19	p < 0,001
6. Септолете тотал	22,70 ± 0,95	p < 0,001

Однако, как видно из *таблицы 1*, цитотоксичность препаратов Тантум Роза и Тантум Верде была существенно ниже, чем у других исследованных лекарственных препаратов. В связи с выявленной цитотоксичностью рабочей концентрации препаратов в дальнейших исследованиях использовались их десятикратные разведения (*табл. 2*).

Наиболее высокая проницаемость мембран лимфоцитов и гибель клеток у здоровых доноров наблюдается под влиянием Хлоргексидина в 10-кратном разведении. Количество погибших лимфоцитов под влиянием этого препарата увеличено в 9,8 раза по сравнению с контрольным уровнем.

Мирамистин в 10-кратном разведении увеличивает гибель лимфоцитов в 5,8 раза по сравнению с контролем. Гексорал и Септолете тотал в 10-кратных разведениях

также увеличивают проницаемость мембран лимфоцитов и вызывают гибель клеток – в 3,5–3,3 раза соответственно.

А препараты на основе бензидамина Тантум Верде и Тантум Роза практически не влияют на этот показатель. Полученные результаты показывают, что мембраны лимфоцитов здоровых доноров не разрушаются под действием препаратов Тантум Верде и Тантум Роза, что в итоге не приводит к их гибели.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние данных лекарственных средств на проницаемость мембран лимфоцитов пациентов с тяжелыми воспалительными заболеваниями; результаты этих экспериментов приведены в *таблице 2*.

Наиболее высокую проницаемость мембран и гибель лимфоцитов пациентов с тяжелым воспалением вызывает Хлоргексидин, который увеличивает гибель лимфоцитов в 8,1 раза по сравнению с контролем. Мирамистин, Гексорал и Септолете тотал также увеличивают проницаемость мембран лимфоцитов и вызывают гибель клеток в 4,4–3,5 раза. Тантум Верде и Тантум Роза гибель лимфоцитов не вызывают.

Полученные данные свидетельствуют о способности исследуемых лекарственных препаратов (Мирамистин, Гексорал, Хлоргексидин, Септолете тотал) вызывать гибель лимфоцитов здоровых доноров и пациентов с тяжелыми воспалительными заболеваниями. Особое внимание следует обратить на то, что при воспалительных заболеваниях наблюдается повреждение слизистой оболочки, что влияет на ее проницаемость и увеличивает возможность поступления лекарственных средств в ткани. Это означает, что данные лекарственные препараты в различных концентрациях могут вступать во взаимодействие с клетками иммунитета в очаге воспаления и негативно влиять на них.

Бензидамин – основное действующее вещество препаратов Тантум Верде и Тантум Роза – не увеличивает проницаемость мембран лимфоцитов и не вызывает их гибель при исследовании как лимфоцитов здоровых доноров, так и лимфоцитов пациентов.

● **Таблица 2.** Влияние препаратов местной антимикробной терапии на жизнеспособность мононуклеарных клеток крови здоровых доноров и пациентов с тяжелым воспалительным процессом (десятикратное разведение рабочей концентрации)

● **Table 2.** Effect of local antimicrobial drugs on the viability of mononuclear blood cells of healthy donors and patients with severe inflammatory process (tenfold dilution of working concentration)

Препараты	Здоровые доноры		Пациенты с тяжелым воспалительным процессом	
	М ± m (среднее значение)	Достоверность отличий от контроля	М ± m (среднее значение)	Достоверность отличий от контроля
Контроль (физиологический раствор)	1,45 ± 0,17		1,85 ± 0,20	
1. Тантум Верде	1,69 ± 0,35	p > 0,05	1,80 ± 0,18	p > 0,05
2. Тантум Роза	1,48 ± 0,19	p > 0,05	2,28 ± 0,14	p > 0,05
3. Мирамистин	8,40 ± 0,25	p < 0,001	7,37 ± 0,36	p < 0,001
4. Гексорал	5,14 ± 0,36	p < 0,001	8,17 ± 0,65	p < 0,001
5. Хлоргексидин	14,17 ± 1,17	p < 0,001	14,97 ± 2,09	p < 0,001
6. Септолете тотал	4,82 ± 0,46	p < 0,001	6,43 ± 0,47	p < 0,001

● **Таблица 3.** Влияние препаратов местной антимикробной терапии на активность NADPH-оксидазной системы нейтрофилов здоровых доноров и пациентов с тяжелым инфекционным воспалением
 ● **Table 3.** Influence of local antimicrobial drugs on the activity of NADPH-oxidase neutrophil system in healthy donors and patients with severe infectious inflammation

Препараты	Здоровые доноры		Пациенты с острым инфекционным воспалительным процессом	
	M ± m (среднее значение), %	Достоверность отличий от контроля	M ± m (среднее значение), %	Достоверность отличий от контроля
Контроль (физиологический раствор)	9,11 ± 1,810		57,85 ± 3,22	
1. Тантум Верде	26,33 ± 3,01	p < 0,001	44,73 ± 1,98	p < 0,005
2. Тантум Роза	14,33 ± 1,91	p < 0,001	46,50 ± 3,99	p > 0,05
3. Мирамистин	9,89 ± 0,75	p > 0,05	47,83 ± 1,68	p < 0,05
4. Гексорал	нет данных		17,45 ± 2,19	p < 0,001
5. Хлоргексидин	10,90 ± 1,63	p > 0,05	23,22 ± 2,26	p < 0,001
6. Септолете тотал	6,48 ± 1,13	p > 0,05	14,72 ± 1,50	p < 0,001

Результаты этого раздела исследования свидетельствуют о том, что ряд препаратов местной антимикробной терапии (Мирамистин, Гексорал, Хлоргексидин, Септолете тотал) способны вызывать не только гибель микроорганизмов, но и гибель лимфоцитов периферической крови как у здоровых доноров, так и у пациентов в очаге воспаления. В противоположность этому другие препараты (Тантум Верде и Тантум Роза) не вызывают повреждения мембран и гибель клеток лимфоидной ткани.

Следует особо отметить, что лимфоциты играют ведущее место в иммунном ответе организма. Именно этим клеткам присуща активация иммунной системы через Т-лимфоциты, ответственные в том числе за инактивацию инфекции, а также В-лимфоциты, которые, в свою очередь, формируют иммунологическую память. За счет того, что каскад реакций иммунного ответа тесно связан с лимфоцитами, их недостаточность или нарушенная активность могут привести к персистенции инфекции в организме.

Для исследования состояния клеток врожденного иммунитета – нейтрофилов изучали влияние лекарственных препаратов на активность NADPH-оксидазной системы нейтрофилов с помощью теста с нитросиним тетразолием в группе здоровых доноров и пациентов с тяжелым воспалительным процессом (табл. 3). Внутриклеточная активация NADPH-оксидазной системы крайне важна для инактивации микроорганизмов, в то же время выход ее продуктов – активных форм кислорода за пределы клетки приводит к вторичной альтерации ткани, а значит, к гибели ее здоровых участков.

При исследовании группы здоровых доноров отмечено, что препараты Тантум Верде и Тантум Роза в 1,5–2,5 раза увеличивают активность NADPH-оксидазной системы нейтрофилов, что интерпретируется как некоторое внутриклеточное увеличение генерации радикалов кислорода, ведущее к увеличению антимикробного потенциала нейтрофилов здоровых доноров. Можно предположить, что бензидамин увеличивает экспрессию рецепто-

ров врожденного иммунитета (toll like receptors – TLR) на поверхности нейтрофилов. Взаимодействие TLR с фрагментами погибших клеток может вызывать активацию NADPH-оксидазы нейтрофилов без участия патогена [3]. Причем наиболее сильными активаторами нейтрофилов являются собственные гистоновые белки погибших клеток организма человека [4].

У пациентов с тяжелым инфекционным воспалительным процессом исходно отмечается высокий уровень НСТ-позитивных нейтрофилов – 57,85 ± 3,22%, что принципиально отличается от аналогичных показателей у здоровых доноров (табл. 3). Под влиянием исследуемых препаратов их численность снижается. Так, снижение активности NADPH-оксидазной системы нейтрофилов незначительно под влиянием препаратов Тантум Верде и Тантум Роза, а также Мирамистина. В то же время после применения препаратов Гексорал, Хлоргексидин и Септолете тотал эти показатели снижались в 3–5 раз. Это говорит о том, что снижение активности NADPH-оксидазной системы нейтрофилов приводит к снижению врожденного антимикробного действия организма.

Результаты второй части этого раздела в целом свидетельствуют о том, что все исследованные препараты уменьшают количество НСТ-позитивных нейтрофилов (табл. 3). Уменьшение количества НСТ-позитивных нейтрофилов принято объяснять либо снижением активности NADPH-оксидазной системы нейтрофилов (снижение антимикробного действия иммунитета), либо образованием нейтрофильной внеклеточной ловушки (НВЛ) (neutrophil extracellular trap – NET). Нейтрофильная внеклеточная ловушка призвана захватывать новые копии микроорганизмов, что в целом положительно сказывается на антимикробном действии иммунной системы, но, с другой стороны, избыток НВЛ приводит к выраженной вторичной альтерации, т. е. гибели нормальной ткани [5]. Определение того или иного поведения ней-

трофилов возможно при исследовании динамики содержания НСТ-положительных нейтрофилов под влиянием препаратов.

Динамические исследования содержания НСТ-положительных нейтрофилов, отражающие активность NADPH-оксидазной системы нейтрофилов пациентов с тяжелым воспалением, проведены для двух препаратов – Тантум Верде и Мирамистина (рис.).

Под влиянием бензидамина в диапазоне 30–90 мин происходит умеренное транзитное снижение количества НСТ-положительных нейтрофилов, что ведет к предотвращению их гибели и поддержанию активности врожденного иммунитета в интервале 120–150 мин.

Динамика содержания НСТ-положительных нейтрофилов под влиянием Мирамистина иная. В первые 30 мин инкубации наблюдается 20%-ный прирост количества НСТ-положительных нейтрофилов, что свидетельствует о внутриклеточной активации NADPH-оксидазной системы. Можно обоснованно предполагать, что данная дополнительная активация NADPH-оксидазы вызывает образование избыточного количества НВЛ, что может привести к повреждению ткани за счет выброса радикалов кислорода из клетки во внеклеточное пространство [5, 6].

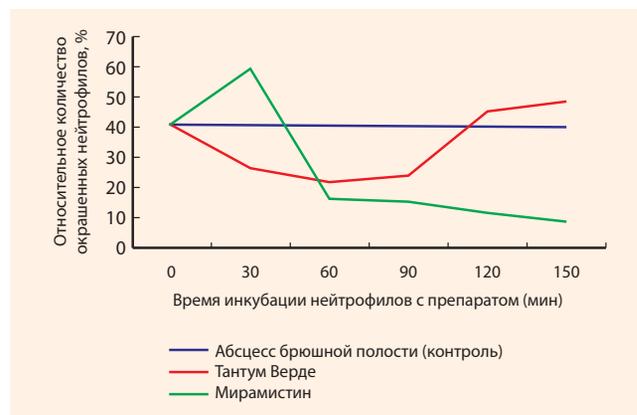
Затем в диапазоне 60–150 мин регистрируется уменьшение количества НСТ-положительных нейтрофилов, вызванное, очевидно, угасанием активности NADPH-оксидазной системы и ослаблением образования активных форм кислорода (снижением антимикробного эффекта). Выявленное равномерное уменьшение количества НСТ-положительных нейтрофилов под влиянием Мирамистина может быть также объяснено гибелью части нейтрофилов, которая происходит при инкубации с препаратом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное изучение ряда препаратов для местной антимикробной терапии: Тантум Верде, Тантум Роза,

● **Рисунок.** Динамика содержания НСТ-положительных нейтрофилов периферической крови пациентов с тяжелыми воспалительными заболеваниями при инкубации с бензидамином (препарат Тантум Верде) и Мирамистином

● **Figure.** Figure. Dynamics of НСТ-positive peripheral blood neutrophils in patients with severe inflammatory diseases during incubation with benzydamine (Tantum Verde) and Miramistin



Мирамистин, Гексорал, Хлоргексидин, Септолете тотал – выявило выраженное повреждающее действие на лимфоциты как здоровых доноров, так и пациентов с тяжелыми воспалительными процессами со стороны некоторых из них.

Под влиянием Мирамистина, Гексорала, Хлоргексидина и Септолете тотал лимфоциты выражено гибнут при использовании концентрации препаратов уже в 10 раз меньшей, чем концентрация в коммерческом образце. Препараты Тантум Верде и Тантум Роза, основу которых составляет бензидамин, гибель лимфоцитов не вызывают [7].

Особое внимание в работе уделяется нейтрофилам, т. к. это терминально дифференцированные лейкоциты,



**ТАНТУМ®
ВЕРДЕ**

ТАНТУМ® ВЕРДЕ ОТ БОЛИ В ГОРЛЕ

СНИМАЕТ БОЛЬ И ВОСПАЛЕНИЕ

**НАДЕЖНЫЙ ДРУГ
ДЕТСКОГО ИММУНИТЕТА¹**

ЛСР-002911/10, П N014279/01, П N014279/02, П N014279/03

Тантум® Верде (бензидамин). Показания к применению: симптоматическая терапия болевого синдрома воспалительных заболеваний полости рта и ЛОР-органов (различной этиологии). Противопоказания: непереносимость компонентов и фруктозы; спрей – до 3 лет; Форте спрей – до 18 лет; раствор – до 12 лет; таблетки – до 6 лет; фенилкетонурия (вкусы «Мята» и «Лимон»). www.angelini.ru | www.tantum-verde.net ANGELINI

ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. НЕОБХОДИМО ПРОКОНСУЛЬТИРОВАТЬСЯ СО СПЕЦИАЛИСТОМ.

Реклама

1. Порядин Г.В. Салмаси Ж.М. Казимирский А.Н. Механизм действия бензидамина на локальное воспаление. Медицинский совет №21, 2018: 72-80. TV/НСР – Layout – 09/11/2018

специализирующиеся на обнаружении и уничтожении патогенов, которые являются ключевыми клетками врожденного иммунитета. После активации они производят большое количество активных форм кислорода для уничтожения патогенных микроорганизмов.

Активность NADPH-оксидазной системы нейтрофилов, генерирующей радикалы кислорода под влиянием препаратов Тантум Верде и Тантум Роза, незначительно увеличивается у здоровых доноров, что крайне полезно для профилактики развития инфекционного процесса на его ранней стадии.

При исследовании нейтрофилов, активированных воспалением (пациенты с острым воспалительным процессом), было выявлено, что все препараты уменьшают активность NADPH-оксидазной системы. У препаратов Гексорал, Хлоргексидин и Септолете тотал отмечается существенное снижение активности NADPH-оксидажной

системы нейтрофилов, что можно интерпретировать как снижение естественной антимикробной активности.

Исследование же динамики активации NADPH-оксидажной системы нейтрофилов позволило выявить разные механизмы влияния Мирамистина и препаратов на основе бензидамина на нее. Характерное для действия Мирамистина резкое повышение NADPH-оксидажной активности с ее существенным последующим снижением, по-видимому, отражает процесс формирования НВЛ, что может приводить к развитию вторичной альтерации ткани, т. е. ее разрушению [5, 8].

Развивающееся под влиянием препарата бензидамина (Тантум Верде) транзиторное ингибирование активности NADPH-оксидажной системы свидетельствует о торможении нетоза нейтрофилов и увеличении их времени жизни, что, по сути, является активацией механизмов врожденного иммунитета [9].



Поступила/Received 25.02.2019

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Виксман М.Е., Маянский А.Н. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: методические рекомендации. Казань, 1979. 12 с. [Vixman M.E., Mayanskiy A.N. Method of estimation of functional activity of human neutrophils on the reaction of nitroblue tetrazolium reduction: methodical recommendations. Kazan, 1979. 12 p.] (In Russ.)
2. Герасимов И.Г., Игнатов Д.Ю. Функциональная неравнозначность нейтрофилов крови человека: генерация активных форм кислорода. *Цитология*. 2001;43(5):432-436. [Gerasimov I.G., Ignatov D.Yu. Functional incomparability of human blood neutrophils: generation of active oxygen species. *Cytology [Citologija]*. 2001;43(5):432-436.] (In Russ.)
3. Garg A.D., Vandenberk L., Fang S., Fasche T., Van Eygen S., Maes J., Van Woensel M., Koks C., Vanthillo N., Graf N., de Witte P., Van Gool S., Salven P., Agostinis P. Pathogen response-like recruitment and activation of neutrophils by sterile immunogenic dying cells drives neutrophil-mediated residual cell killing. *Cell Death Differ.* 2017 May;24(5):832-843. doi: 10.1038/cdd.2017.15.
4. Zhang Y., Guan L., Yu J., Zhao Z., Mao L., Li S., Zhao J. Pulmonary endothelial activation caused by extracellular histones contributes to neutrophil activation in acute respiratory distress syndrome. *Respir Res.* 2016 Nov 21;17(1):155. doi: 10.1186/s12931-016-0472-y.
5. Jia S.H., Parodo J., Charbonney E., Tsang J.L.Y., Jia S.Y., Rotstein O.D., Kapus A., Marshall J.C. Activated neutrophils induce epithelial cell apoptosis through oxidant-dependent tyrosine dephosphorylation of caspase-8. *Am J Pathol.* 2014 Apr;184(4):1030-1040. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.12.031.
6. Singel K.L., Segal B.H. NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clin Sci (Lond)*. 2016 Apr 1;130(7):479-90. doi: 10.1042/CS20150660.
7. Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н. Механизм действия бензидамина на локальное инфекционное воспаление. *Медицинский совет*. 2018;21:78-86. doi: 10.21518/2079-701X-2018-21-78-86. [Poryadin G.V., Salmasi Zh.M., Kazimirskiy A.N. Mechanism of benzydamine action on local infectious inflammation. *Medical advice [Medicinskij sovet]*. 2018;21:78-86. doi: 10.21518/2079-701X-2018-21-78-86.] (In Russ.)
8. Scozzi D., Wang X., Liao F., Liu Z., Zhu J., Pugh K., Ibrahim M., Hsiao H.M., Miller M.J., Yizhan G., Mohanakumar T., Krupnick A.S., Kreisel D., Gelman A.E. Neutrophil extracellular trap fragments stimulate innate immune responses that prevent lung transplant tolerance. *Am J Transplant.* 2018 Oct 31. doi: 10.1111/ajt.15163.
9. Mortaz E., Alipoor S.D., Adcock I.M., Mumby S., Koenderman L. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol.* 2018 Oct 2;9:2171. doi: 10.3389/fimmu.2018.02171.