

Современные иммунофармакологические возможности оценки свойства бензидамина для влияния на клетки врожденного и адаптивного иммунитета

А.Н. Казимирский^{1✉}, ORCID: 0000-0002-3079-4089, alnica10@mail.ru

Ж.М. Салмаси¹, ORCID: 0000-0001-8524-0019, profjms@yandex.ru

Г.В. Порядин¹, ORCID: 0000-0003-2010-3296, poryadin_GV@rsmu.ru

И.В. Кукус², ORCID: 0000-0003-1449-8711, ilyakukes@gmail.com

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

² Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов; 109147, Россия, Москва, ул. Малая Калитниковская д. 2, к. 1

Резюме

Введение. Учитывая развитие технологий и методик, сегодня крайне актуально продолжать изучение особенностей взаимодействия лекарственных препаратов, разработанных и внедренных в клиническую практику в 1960–1980-е гг., со звеньями иммунитета, находящимися в слизистой, так как многие из этих препаратов имеют местные лекарственные формы. Одним из таких препаратов является бензидамина гидрохлорид, зарегистрированный как нестероидный противовоспалительный препарат с расширенными фармакодинамическими свойствами.

Цель. Оценить влияние препарата бензидамина гидрохлорида на клетки врожденного и приобретенного иммунитета, находящиеся в слизистой, на модели *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании использовали клеточные фракции нейтрофилов, выделенные у пациентов с инфекционным воспалением. Стерильно выделенные из венозной крови больных нейтрофилы переносили в среду RPMI-1640, куда добавляли исследуемый фармакологический препарат и проводили инкубацию с клетками. Для обнаружения и подсчета нейтрофильных экстраклеточных ловушек использовали флуоресцентную микроскопию. Также в исследовании использовали клеточные фракции лимфоцитов, выделенные у пациентов с инфекционным воспалением. В работе применяли коммерческий препарат, содержащий бензидамина гидрохлорид – Тантум Верде (Angelini Pharma S.p.a., Италия).

Результаты и обсуждение. Бензидамин вызывает значительное ингибирование формирования нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Это говорит о том, что в начале применения препарат способствует усилению антимикробного ответа организма, а затем по мере снижения концентрации демонстрирует классические противовоспалительные свойства. Также препарат усиливает структуру нейтрофильной экстраклеточной ловушки. Под влиянием бензидамина общее количество В-лимфоцитов испытывает тенденцию к нормализации. Эти данные позволяют сделать вывод о способности препарата ослаблять тяжесть воспалительного процесса, по-видимому, ингибируя действие воспалительных цитокинов.

Заключение. В ходе исследования *in vitro* показано, что бензидамина гидрохлорид (Тантум Верде) обладает иммуномодулирующими свойствами в отношении клеток врожденного иммунитета – нейтрофилов, и подтверждены его противовоспалительные свойства в отношении клеток адаптивного иммунитета – лимфоцитов.

Ключевые слова: нейтрофильные экстраклеточные ловушки, иммунитет, лимфоциты, бензидамин, иммуномодуляторы

Для цитирования: Казимирский А.Н., Салмаси Ж.М., Порядин Г.В., Кукус И.В. Современные иммунофармакологические возможности оценки свойства бензидамина для влияния на клетки врожденного и адаптивного иммунитета.

Медицинский совет. 2021;(11):111–117. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-11-111-117>.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Modern immunopharmacological methods of discovering new properties of benzydamine by its influence on innate and adaptive immune cells

Alexander N. Kazimirskii^{1✉}, ORCID: 0000-0002-3079-4089, alnica10@mail.ru

Jean M. Salmasi¹, ORCID: 0000-0001-8524-0019, profjms@yandex.ru

Gennady V. Poryadin¹, ORCID: 0000-0003-2010-3296, poryadin_GV@rsmu.ru

Ilya V. Kukes², ORCID: 0000-0003-1449-8711, ilyakukes@gmail.com

¹ Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia

² International Association of Clinical Pharmacologists and Pharmacists; 2, Bldg. 1, Malaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109147, Russia

Abstract

Introduction. Considering the development of technologies and techniques, it is highly relevant today to continue studying the features of interaction of drugs developed and introduced into clinical practice in the 1960s and 1980s with the elements of the immune system located in the mucosa, since many of these drugs have local dosage forms. One such drug is benzidamine hydrochloride, registered as a nonsteroidal anti-inflammatory drug with extended pharmacodynamic properties.

Objective. To evaluate the effect of benzidamine hydrochloride preparation on the cells of innate and acquired immunity located in the mucosa in an in vitro model.

Materials and Methods. Cell fractions of neutrophils isolated from patients with infectious inflammation were used in the study. Sterile isolated neutrophils from the venous blood of patients were transferred into RPMI-1640 medium, where the investigated pharmacological drug was added, and incubation with cells was performed. Fluorescence microscopy was used to detect and count neutrophil extracellular traps. Cell fractions of lymphocytes isolated from patients with infectious inflammation were also used in the study. A commercial drug containing benzidamine hydrochloride, Tantum Verde (Angelini Pharma S.p.a., Italy), was used in the study.

Results and discussion. Benzidamine causes significant inhibition of neutrophil extracellular trap formation. This suggests that at the beginning of application the drug enhances the antimicrobial response of the body, and then as the concentration decreases it demonstrates classic anti-inflammatory properties. The drug also enhances the neutrophil extracellular trap structure. The total number of B-lymphocytes tends to normalize under the effect of benzidamine. These data allow us to conclude about the ability of the drug to attenuate the severity of the inflammatory process, apparently by inhibiting the action of inflammatory cytokines.

Conclusion. In the course of the in vitro study it was shown that benzidamine hydrochloride (Tantum Verde) has immunomodulatory properties against innate immunity cells – neutrophils, and its anti-inflammatory properties against adaptive immunity cells – lymphocytes – were confirmed.

Keywords: neutrophil extracellular traps, immunity, lymphocytes, benzidamine, immunomodulators

For citation: Kazimirskii A.N., Salmasi J.M., Poryadin G.V., Kukes I.V. Modern immunopharmacological methods of discovering new properties of benzydamine by its influence on innate and adaptive immune cells. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*. 2021;(11):111–117. (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2021-11-111-117>.

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные экстраклеточные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps, NET) возникают в результате высвобождения гранулярного и ядерного содержимого нейтрофилов во внеклеточное пространство в ответ на различные классы микроорганизмов, растворимые факторы и собственные модифицированные антигены организма. Нейтрофильные экстраклеточные ловушки состоят из деконденсированных волокон хроматина, покрытых антимикробными гранулярными и цитоплазматическими белками, такими как миелопероксидаза, эластаза нейтрофилов (NE) и α -дефензины. Центральным внутриклеточным событием образования NET является удаление гистонов пептидиларгининдезиминой 4 (PAD4) [1, 2].

Во многих исследованиях продемонстрировано, что образование NET является эффективным механизмом борьбы с вторгающимися микроорганизмами, поскольку недостаточность высвобождения NET или гидролиз основной нуклеотидной цепи NET бактериальными ДНКазами делает организм человека восприимчивым к инфекциям. Основная роль NET – предотвращение распространения микроорганизмов в организме.

Избыток образования NET имеет и обратную сторону. Патогенная роль избыточного образования NET была описана для многих воспалительных заболеваний человека как инфекционного, так и неинфекционного происхождения. Негативный эффект чрезмерного высвобождения NET особенно важен при заболеваниях легких, поскольку они могут легче формироваться в легочных альвеолах, вызывая их повреждение. Более того, NET

и связанные с ними молекулы способны напрямую вызывать гибель эпителиальных и эндотелиальных клеток. Массивное образование NET было зарегистрировано при нескольких легочных заболеваниях, включая бронхиальную астму, хроническую обструктивную болезнь легких, муковисцидоз, респираторно-синцитиальный вирусный бронхит, грипп, бактериальную пневмонию и туберкулез. В настоящее время общепринятым является мнение о том, что образование нейтрофильных экстраклеточных ловушек должно строго регулироваться для избегания повреждения тканей и избыточной гемокоагуляции [1].

Однако исследования больных с воспалительными заболеваниями различного происхождения показывают, что помимо общей численности существенно изменяется и морфологическая структура нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Эти наблюдения заставили углубленно подойти к корректной оценке численности NET и потребовали разработки нового метода их регистрации, позволяющего регистрировать нативные нейтрофильные экстраклеточные ловушки.

Поверхностные рецепторы лимфоцитов представляют собой интегральные белки мембран, чувствительные к факторам микроокружения (цитокинам, белкам острой фазы, фармакологическим препаратам). Лимфоциты, будучи вовлечены во взаимодействие с антиген-презентирующими клетками и находясь под действием цитокинов, демонстрируют ряд изменений, направленных на распознавание и устранение патогенного фактора, отражая таким образом воспалительную реакцию клеток адаптивного звена иммунной системы.

Совокупные иммунные изменения в ходе развития ответной патологической реакции могут быть разделены по характеру влияний, действующих на лимфоциты. Введение фармакологического препарата в среду инкубации лимфоцитов позволяет выявить характерные для действующего вещества изменения экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов, которые под влиянием совокупности действующих на них факторов могут быть подробно исследованы и быть полезными для оценки влияния фармакологического препарата на параметры адаптивного иммунитета.

Исследование экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов позволяет обнаружить как воспалительные иммунологические изменения, так и их изменения под влиянием фармакологического препарата, что адекватно цели настоящего исследования.

Также острым остается вопрос фармакотерапии инфекционно-воспалительных заболеваний. Помимо системной антимикробной терапии, практикующий врач нуждается и в эффективной местной фармакотерапии. Если рассматривать заболевания, которые являются осложнениями ОРВИ, то на первое место выходит острый тонзиллофарингит, который в ряде случаев имеет тяжелую форму течения с формированием осложнений в виде паратонзиллита и паратонзиллярного абсцесса. Оба этих негативных процесса связаны с негативным поведением клеток иммунной системы, поэтому крайне актуальным является изучение возможности современных препаратов влиять и профилировать эти нежелательные процессы. К таким препаратам относится бензидамин гидрохлорид.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Общее для всех частей исследования

Пациенты. В работе использовали периферическую кровь 12 пациентов с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями (абсцесс брюшной полости – аппендицит, панкреонекроз, калькулезный холецистит) в острый период с высокими показателями лейкоцитоза (10–12 тыс./мкл).

Статистическая обработка. С целью оценки достоверности регистрируемых изменений статистическую обработку полученных результатов проводили при большой выборке с помощью t-критерия Стьюдента, при малой выборке с ненормальным распределением, а также при сравнении попарно связанных вариантов – с применением непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни.

Часть 1: изучение влияния бензидамин на клетки врожденного иммунитета

Препараты. Для модулирования формирования NET использовали бензидамин в различных концентрациях (от 15 до 0,15 мкг/мл). В части экспериментов в качестве препарата сравнения применяли диклофенак, который использовали в конечной концентрации 3 мкг/мл.

Получение клеточных фракций. В исследовании использовали клеточные фракции нейтрофилов. Венозную кровь (10 мл) больных помещали в силиконизированную пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА)

для предотвращения свертывания. Для выделения нейтрофилов из венозной крови, обработанной ЭДТА, кровь разводили в 2 раза натрий-фосфатным буферным раствором, pH 7,4, и наслаивали на двойной градиент плотности стерильных растворов фиколла-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляла 1,077, а нижнего – 1,095. После центрифугирования (1 600 об/мин, 30 мин) на границе между градиентами появлялось кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%, эритроциты при этом осаждались на дно пробирки. Кольцо нейтрофильных гранулоцитов отбирали, переносили в пробирки для центрифугирования, дважды отмывали от примесей фиколла буферным раствором, используя центрифугирование для осаждения клеток (1 200 об/мин, 15 мин). Стерильно выделенные нейтрофилы переносили в среду RPMI-1640 и использовали в экспериментах по культивированию. Жизнеспособность выделенных нейтрофилов составляла не менее 99%, которую определяли в тесте с 0,1%-м раствором трипанового синего.

Культивирование клеток крови с препаратами. К стерильно выделенным нейтрофилам добавляли исследуемый фармакологический препарат и проводили инкубацию с клетками в атмосфере 5%-го CO₂ при 37 °C во всех экспериментах. В пробе объемом 100 мкл, приготовленной на среде RPMI-1640, содержались нейтрофилы и исследуемый фармакологический препарат. Конечная концентрация в среде культивирования составляла 2 x 10⁵ клеток/мл.

Иммунофлюоресцентное окрашивание нейтрофильных экстраклеточных ловушек. Применялся авторский метод по патентной заявке RU2021104936. Для обнаружения и подсчета NET использовали флюоресцентную микроскопию. Для этого после окончания инкубации нейтрофилы помещали в лунки на предметном стекле, образованные наплавлением пленки Parafilm (Sigma) на стекло с отверстиями диаметром 5 мм. Стекло в лунках предварительно обрабатывали 0,1%-м поли-L-лизинном для увеличения адгезии клеток. Затем в каждую лунку вносили 10 мкл суспензии нейтрофилов из проб после культивирования. Для адгезирования нейтрофилов предметные стекла с нанесенной суспензией нейтрофилов помещали во влажную камеру и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. После окончания процедуры адгезии в лунки добавляли 10 мкл флюоресцентного красителя SYBR Green (Evrogen), и окрашенные пробы выдерживали в темноте в течение 10 мин при 37 °C. Для удаления излишков красителя предметные стекла с адгезированными нейтрофилами трижды промывали в натрий-фосфатном буферном растворе в течение 5 мин и микроскопировали под иммерсией. Среди 100 нейтрофилов подсчитывали количество NET. Результаты выражали в процентах как отношение количества NET к общему количеству нейтрофилов.

Часть 2: изучение влияния бензидамин на клетки адаптивного иммунитета

Получение клеточных фракций лимфоцитов. В исследовании использовали клеточные фракции лимфоцитов. Венозную кровь больных помещали в силиконизированную пробирку с ЭДТА для предотвращения свертывания.

Лимфоциты выделяли в одноступенчатом градиенте плотности по методу А. Вбуйт [3] в стерильных условиях. Кровь разводили 1 : 2 раствором 50 мМ натрий-фосфатным буферным раствором, pH 7,4, и наслаивали 10 мл разведенной крови на 3 мл раствора фиколла-верографина с удельным весом 1,077 и центрифугировали 30 мин при 600 g. Мононуклеарные клетки, содержащиеся в интерфазе, осторожно собирали, переносили в силиконизированные пробирки и трижды отмывали ресуспендированием с последующим центрифугированием в 50 мМ натрий-фосфатным буферном растворе при 300 g в течение 10 мин. Клетки, предназначенные для определения исходной экспрессии CD-антигенов на лимфоцитах, ресуспендировали в буферном растворе с фосфатами, доводя до концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл, pH 7,4. Содержание лимфоцитов в клеточной взвеси определяли их визуальным подсчетом в камере Горяева. Жизнеспособность лимфоцитов, определяемая по прокрашиванию погибших клеток 0,1%-м раствором трипанового синего, составила не менее 98%.

Определение содержания в периферической крови и в культуре *in vitro* лимфоцитов, экспрессирующих поверхностные антигены. Определение содержания в периферической крови и в культуре *in vitro* лимфоцитов, экспрессирующих антигены CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD72, CD38, CD25, CD71, HLA-DR, CD95, CD54, проводили с помощью моноклональных антител (ЛТ, РФ) в реакции непрямой иммунофлюоресценции. Для оценки исходной экспрессии поверхностных антигенов лимфоцитами периферической крови использовали взвесь клеток в среде RPMI-1640, pH 7,4.

Культивирование лимфоцитов с препаратом. К стерильно выделенным лимфоцитам добавляли исследуемый фармакологический препарат и проводили инкубацию с клетками в атмосфере 5%-го CO_2 при 37 °C в течение 2 ч во всех экспериментах. В пробе объема 100 мкл, приготовленной на среде RPMI-1640, содержались лимфоциты и исследуемый фармакологический препарат в необходимой концентрации. Конечная концентрация в среде культивирования составляла 2×10^5 клеток/мл.

Иммунофлюоресцентное окрашивание лимфоцитов. Для обнаружения и подсчета лимфоцитов использовали флюоресцентную микроскопию. Для этого после окончания инкубации лимфоциты помещали в лунки на предметном стекле, образованные наплавлением пленки Parafilm (Sigma) на стекло с отверстиями диаметром 5 мм. Стекло в лунках предварительно обрабатывали 0,1%-м поли-L-лизинном для увеличения адгезии клеток. Затем в каждую лунку вносили 10 мкл суспензии лимфоцитов из проб после культивирования клеток с препаратом. Адгезирование лимфоцитов на стекло проводили во влажной камере в течение 30 мин при 37 °C. После окончания процедуры адгезии в лунки добавляли 10 мкл раствора моноклональных антител. Препарат выдерживали в течение 30 мин при 4 °C, затем снова промывали 50 мМ натрий-фосфатным буферным раствором и вносили в лунки по 10 мкл рабочего раствора Fab-фрагментов антител мыши, меченых флюорохромом. Для связывания меченых Fab-фрагментов с моноклональными антителами, локализованными на поверхности лимфоцитов, препараты инкубировали 30 мин при +4 °C. После окончания

процедуры связывания препараты промывали охлажденным 50 мМ натрий-фосфатным буферным раствором и покрывали 20 мкл раствора глицерина с натрий-фосфатным буферным раствором (в соотношении 1 : 1). Препарат микроскопировали в водной иммерсионной системе с использованием люминесцентного микроскопа «Люам И-3».

Препараты. В работе применяли коммерческий препарат Тантум Верде в качестве источника бензидамина, который при инкубации с лимфоцитами использовали в конечной концентрации 15 мкг/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть 1: изучение влияния бензидамина на клетки врожденного иммунитета

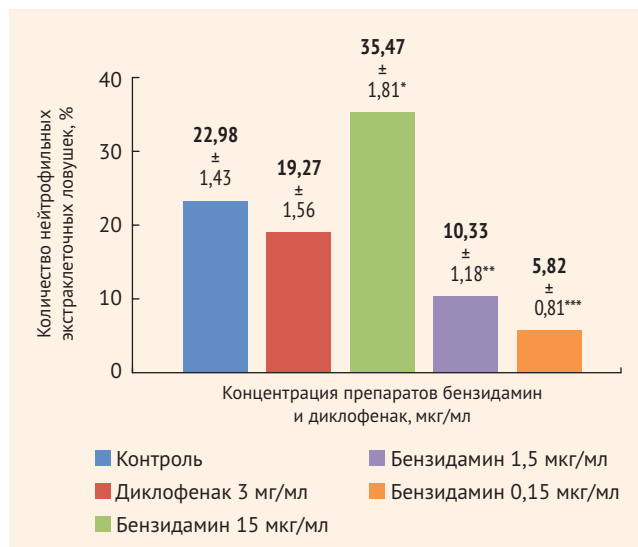
В исследовании проводили определение количества нейтрофильных экстраклеточных ловушек под влиянием препарата с классическим нестероидным противовоспалительным действием – диклофенака и препарата местной противовоспалительной и противомикробной терапии – бензидамина. Полученные результаты представлены на рис. 1.

Диклофенак ингибирует раскрытие NET при его использовании в оптимальной для человека концентрации 3 мкг/мл не более чем на 20%. Этот эффект обусловлен ингибированием NADPH-оксидазы под действием этого препарата. Формирование NET зависит от активности NADPH-оксидазы. В исследованиях на клеточной линии A549 установлена пропорциональная зависимость между активацией NADPH-оксидазы, которая играет ключевую роль в регуляции экспрессии COX-2/PGE(2) [4].

Под влиянием бензидамина в концентрации 15 мкг/мл формирование NET увеличивается на 20%. Бензидамин в низкой концентрации (0,15 мкг/мл) вызывает значительное ингибирование формирования NET (в 5 раз). Полученные результаты (рис. 1) демонстрируют выражен-

● **Рисунок 1.** Формирование нейтрофильных экстраклеточных ловушек под влиянием бензидамина и диклофенака

● **Figure 1.** Formation of neutrophil extracellular traps under the influence of benzydamine and diclofenac



Примечание. Результаты представлены как $M \pm m$ (Среднее \pm ошибка среднего).
* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (по сравнению с контролем).

ный двухфазный характер действия бензидамина в зависимости от его концентрации.

Прирост количества NET под влиянием высокой концентрации бензидамина (15 мкг/мл) может быть связан с активацией экспрессии рецепторов врожденного иммунитета (TLR). Это предположение базируется на ранее выявленной способности бензидамина активировать NADPH-оксидазу в активированных воспалением нейтрофилах, действуя в концентрации 15 мкг/мл.

Подавление формирования NET низкими концентрациями бензидамина может быть объяснено структурным сходством между активным центром молекулы бензидамина и функционально активной группой атомов в молекуле одного из мембранных липидов, являющегося физиологическим индуктором формирования NET [5]. Результаты этого раздела работы показывают перспективность сочетания классических нестероидных противовоспалительных препаратов с препаратами – конкурентными ингибиторами некоторых мембранных липидов [6].

После определения количества NET после инкубации с препаратами была оценена их морфологическая структура. Данные представлены на рис. 2.

Часть 2: изучение влияния бензидамина на клетки адаптивного иммунитета

В исследовании проводили определение изменения популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с острым инфекционным воспалительным процессом под влиянием бензидамина. Результаты этого исследования в сопоставлении с показателями здоровых доноров приведены в табл.

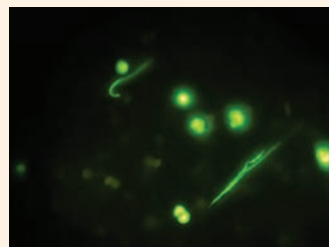
Особый интерес представляет анализ субпопуляции активированных NK-клеток (CD16+–лимфоцитов). Их количество невелико у здоровых доноров и составляет $4,78 \pm 0,52\%$. У пациентов с инфекционным воспалением их количество возрастает до уровня $8,99 \pm 1,30\%$, а под влиянием бензидамина их численность имеет тенденцию к нормализации, приближаясь к уровню здоровых доноров: $6,84 \pm 0,67\%$. Полученные результаты свидетельствуют о способности бензидамина понижать цитотоксичность субпопуляции активированных NK-клеток.

Оценивать процесс разрешения воспаления возможно по поведению В-лимфоцитов. Общее количество В-лимфоцитов (CD20+–клеток) у больных с острым инфекционным воспалением закономерно увеличивается до уровня $18,66 \pm 1,01\%$ ($p < 0,05$) по сравнению с контрольным уровнем здоровых доноров: $10,11 \pm 0,41\%$. Под влиянием бензидамина общее количество В-лимфоцитов имеет тенденцию к нормализации и составляет $14,69 \pm 0,96\%$.

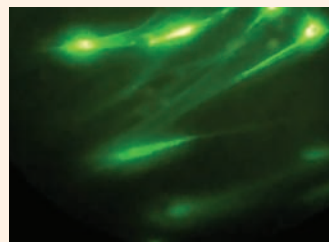
Отдельное внимание следует уделить функциональному маркеру лимфоцитов CD54 (ICAM-1), уровень которого коррелирует с тяжестью воспалительного процесса, поскольку экспрессия CD54 индуцируется цитокинами, такими как интерлейкин-1 β и фактор некроза опухоли- α [7]. У пациентов с острым инфекционным процессом количество CD54+–клеток закономерно увеличивается почти в два раза по сравнению уровнем здоровых доноров ($10,37 \pm 0,42\%$ у больных и $5,49 \pm 0,98\%$ у здоро-

● **Рисунок 2.** Морфологическая структура нейтрофильных экстраклеточных ловушек

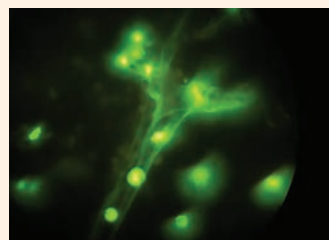
● **Figure 2.** Morphological structure of neutrophil extracellular traps



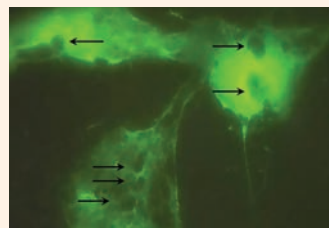
Тип 1: одиночная форма. Исходная морфология NET при инфекционном воспалении без стимуляции препаратом. Характеристика морфологии: форма NET в виде одиночных волокон ДНК, которые, скорее всего, не способны к захвату гибнущих клеток и патогенов, а также к сжатию с последующим фагоцитозом.



Тип 2: разветвленная структура, вариант 1. Раскрытие NET без влияния лекарственного препарата. Образующиеся сети тонкие.



Тип 2: разветвленная структура, вариант 2. Бензидамин в концентрации 15 мкг/мл увеличивает количество NET и изменяет структуру сети, преобразуя одиночные волокна ДНК в разветвленную структуру нейтрофильной сети, усиливая ее антимикробный эффект для благоприятного течения воспалительного процесса.



Тип 3: захват нейтрофильной ловушкой *Staphylococcus aureus*. NET, стимулированная бензидамином в концентрации 15 мкг/мл, захватывает патоген (отмечен стрелками).

вых доноров). Бензидамин значительно подавляет экспрессию рецептора CD54, практически нормализуя этот показатель: $3,16 \pm 0,21\%$. Эти данные позволяют сделать вывод о способности бензидамина ослаблять тяжесть воспалительного процесса, по-видимому, ингибируя действие воспалительных цитокинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальность проведенного исследования определяется клиническим значением местной противовоспалительной терапии при инфекционно-воспалительных процессах и оценки способности этой фармакотерапии оказывать противовоспалительные каскады. Одно из ведущих мест в борьбе с инфекционным воспалительным процессом отводится NET. С одной стороны, NET необходимы для уничтожения патогена, с другой – их длительная и чрезмерная активация может приводить к поражению тканей, в частности к формированию таких осложнений, как паратонзиллит или паратонзиллярный абсцесс [8, 9].

● **Таблица.** Популяционный и субпопуляционный составы лимфоцитов периферической крови больных острым инфекционным воспалением под влиянием бензидамина в сравнении со здоровыми донорами, %

● **Table.** Population and subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes of patients with acute infectious inflammation under the influence of benzydamine compared with healthy donors, %

Маркеры лимфоцитов	Здоровые доноры (n = 20)	Больные, контроль (n = 6)	Бензидамин, 15 мкг/мл
Т-лимфоциты			
CD3	66,63 ± 1,99	62,75 ± 2,02	57,22 ± 2,63*
CD4	37,78 ± 1,65	31,59 ± 1,12	33,14 ± 1,18
CD8	26,18 ± 0,96	23,63 ± 1,18	24,32 ± 1,10
NK-клетки			
CD16	12,88 ± 0,82	13,12 ± 0,88	10,87 ± 0,66
CD56	4,78 ± 0,52	8,99 ± 1,30	6,84 ± 0,67
В-лимфоциты			
CD20	10,11 ± 0,41	18,66 ± 1,01	14,69 ± 0,96*
CD72	9,39 ± 0,80	5,41 ± 0,34	4,10 ± 0,29
CD38	7,33 ± 0,52	5,71 ± 0,52	5,24 ± 0,41
Активационные маркеры лимфоцитов			
CD23	5,41 ± 0,61	9,16 ± 1,12	10,68 ± 0,61
CD25	6,09 ± 0,40	8,84 ± 0,86	11,30 ± 0,54*
CD71	6,30 ± 0,43	11,34 ± 0,63	10,52 ± 0,65
HLA-DR	11,68 ± 0,52	11,85 ± 1,10	13,18 ± 0,63
CD95	4,66 ± 0,38	9,33 ± 0,69	8,81 ± 1,14
CD54, ICAM-1	5,49 ± 0,98	10,37 ± 0,42	3,16 ± 0,21**

Примечание. Результаты представлены как M ± m (Среднее ± ошибка среднего).
* – p < 0,05, ** – p < 0,01 (по сравнению с контролем).

В результате исследования были получены новые данные о дозозависимой способности бензидамина влиять на поведение NET. В исходных концентрациях препарат оказывает стимулирующее действие в отношении NET, что повышает активность антимикробного звена

врожденного иммунитета, например в отношении клинически значимого *Staphylococcus aureus*.

При этом, исходя из фармакокинетических свойств препарата, после проникновения в очаг воспаления в течение некоторого времени его концентрация снижается, что меняет результат воздействия бензидамина на NET. С уменьшением концентрации бензидамина проявляются его противовоспалительные качества: он ограничивает активность NET, а значит, предотвращает нежелательные последствия для организма. В итоге полученные данные указывают на дозозависимый иммуномодулирующий эффект бензидамина.

Другим важнейшим звеном антимикробной системы организма является адаптивный иммунитет. Наиболее значимыми иммунными клетками, относящимися к адаптивному иммунитету, являются Т-лимфоциты. Полученные в ходе исследования данные говорят о выраженном противовоспалительном действии бензидамина на адаптивную систему иммунитета за счет изменений в популяционном составе лимфоцитов, изначально активированных в ходе воспалительной реакции.

Так, например, в NK-клеточном звене иммунной системы наблюдается тенденция к нормализации численности субпопуляции активированных NK-клеток (CD56+клеток), что указывает на противовоспалительный характер действия препарата. Другой маркер острого воспаления – CD54: его высокий уровень напрямую коррелирует с тяжестью воспалительного процесса. В ходе исследования показано, что бензидамин снижает количество лимфоцитов, экспрессирующих рецептор CD54, а значит, он снижает остроту и выраженность воспалительного процесса.

Также следует обратить внимание и на тот факт, что, несмотря на выявленные иммуномодулирующие свойства бензидамина в отношении иммунных клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета, препарат сохраняет высокий профиль безопасности. Ведь ранее было продемонстрировано, что Тантум Верде не обладает цитотоксическим действием в отношении этих клеток в сравнении, например, с другими лекарственными средствами, имеющими схожие показания к применению [9].

Поступила / Received 21.04.2021
Поступила после рецензирования / Revised 11.05.2021
Принята в печать / Accepted 12.05.2021

Список литературы

- Porto B.N., Stein R.T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front Immunol.* 2016;7:311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00311>.
- Liu T., Wang F.P., Wang G., Mao H. Role of Neutrophil Extracellular Traps in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl.)*. 2017;130(6):730–736. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.201608>.
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77–89. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>.
- Schuetz J., Schuetz H., Oberoi R., Koch A.K., Pretzer S., Luchtefeld M. et al. NADPH Oxidase NOX2 Mediates TLR2/6-Dependent Release of GM-CSF from Endothelial Cells. *FASEB J.* 2017;31(6):2612–2624. <https://doi.org/10.1096/fj.201600729R>.
- Ma R., Xie R., Yu C., Si Y., Wu X., Zhao L. et al. Phosphatidylserine-Mediated Platelet Clearance by Endothelium Decreases Platelet Aggregates and Procoagulant Activity in Sepsis. *Sci Rep.* 2017;7(1):4978. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04773-8>.
- Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Кукес И.В., Казимирский А.Н., Данилов А.Б., Лазарева Н.Б., Данилов А.Б. Современные знания о воспалительных заболеваниях различной локализации и этиологии: новые возможности фармакотерапии. *Фарматека.* 2020;27(14):37–46. Режим доступа: <https://pharmateca.ru/ru/archive/article/39783>.
- Mitachi T., Kouzui M., Maruyama R., Yamashita K., Ogata S., Kojima H., Itagaki H. Some Non-Sensitizers Upregulate CD54 Expression by Activation of the NLRP3 Inflammasome in THP-1 Cells. *J Toxicol Sci.* 2019;44(3):213–224. <https://doi.org/10.2131/jts.44.213>.
- Порядин Г.В., Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н. Механизм действия бензидамина на локальное инфекционное воспаление. *Фарматека.* 2018;13(366):76–83. <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2018.13.76-83>.
- Салмаси Ж.М., Казимирский А.Н., Антонова Е.А., Порядин Г.В. Влияние препаратов местной антимикробной терапии на свойства клеток врожденного и адаптивного иммунитета. *Медицинский совет.* 2019;8(7):76–82. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-76-82>.

References

1. Porto B.N., Stein R.T. Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front Immunol.* 2016;7:311. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00311>.
2. Liu T., Wang F.P., Wang G., Mao H. Role of Neutrophil Extracellular Traps in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl).* 2017;130(6):730–736. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.201608>.
3. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77–89. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>.
4. Schuett J., Schuett H., Oberoi R., Koch A.K., Pretzer S., Luchtefeld M. et al. NADPH Oxidase NOX2 Mediates TLR2/6-Dependent Release of GM-CSF from Endothelial Cells. *FASEB J.* 2017;31(6):2612–2624. <https://doi.org/10.1096/fj.201600729R>.
5. Ma R., Xie R., Yu C., Si Y., Wu X., Zhao L. et al. Phosphatidylserine-Mediated Platelet Clearance by Endothelium Decreases Platelet Aggregates and Procoagulant Activity in Sepsis. *Sci Rep.* 2017;7(1):4978. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04773-8>.
6. Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kukes I.V., Kazimirskii A.N., Danilov A.N., Lazareva N.B., Danilov A.B. Modern Knowledge about Inflammatory Diseases of Various Localization and Etiology: New Possibilities of Pharmacotherapy. *Farmateka = Pharmateca.* 2020;27(14):37–46. (In Russ.) Available at: <https://pharmateka.ru/ru/archive/article/39783>.
7. Mitachi T., Kouzui M., Maruyama R., Yamashita K., Ogata S., Kojima H., Itagaki H. Some Non-Sensitizers Upregulate CD54 Expression by Activation of the NLRP3 Inflammasome in THP-1 Cells. *J Toxicol Sci.* 2019;44(3):213–224. <https://doi.org/10.2131/jts.44.213>.
8. Poryadin G.V., Salmasi J.M., Kazimirsky A.N. The Mechanism of Benzydamine Action on Local Infectious Inflammation. *Farmateka = Pharmateca.* 2018;13(366):76–83. (In Russ.) <https://doi.org/10.18565/pharmateca.2018.13.76-83>.
9. Salmasi J.M., Kazimirskii A.N., Antonova E.A., Poryadin G.V. Evaluation of Influence Several Drugs with Local Antimicrobial Activity against Local Immunity Cells. *Meditsinskiy sovet = Medical Council.* 2019;8(76–82). (In Russ.) <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-8-76-82>.

Информация об авторах:

Казимирский Александр Николаевич, д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник отдела молекулярных технологий, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; alnica10@mail.ru

Салмаси Жан Мустафаевич, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; profjms@yandex.ru

Порядин Геннадий Васильевич, чл.-корр. РАН, д.м.н., профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова; 117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1; poryadin_GV@rsmu.ru

Кукес Илья Владимирович, к.м.н., лауреат гранта Президента РФ, врач – клинический фармаколог, врач-иммунолог, руководитель научно-клинического отдела, Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов; 109147, Россия, Москва, ул. Малая Калитниковская д. 2, к. 1; ilyakukes@gmail.com

Information about the authors:

Alexander N. Kazimirskii, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher, Department of Molecular Technologies, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; alnica10@mail.ru

Jean M. Salmasi, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Faculty of Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; profjms@yandex.ru

Gennady V. Poryadin, Corr. Member RAS, Dr. Sci. (Med.), Professor, Department of Pathophysiology and Clinical Pathophysiology, Faculty of Medicine, Pirogov Russian National Research Medical University; 1, Ostrovityanov St., Moscow, 117997, Russia; poryadin_GV@rsmu.ru

Ilya V. Kukes, Cand. Sci. (Med.), Laureate of the Grant of the President of the Russian Federation, Clinical Pharmacologist, Immunologist, Head of the Scientific and Clinical Department, International Association of Clinical Pharmacologists and Pharmacists; 2, Bldg. 1, Malaya Kalitnikovskaya St., Moscow, 109147, Russia; ilyakukes@gmail.com