

О.Ф. МЕЛЬНИКОВ, И.С. ЗАРИЦКАЯ, Л.А. ПОЗНЯК, О.Г. РЫЛЬСКАЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ АНТИСЕПТИЧЕСКИХ И ПРОТИВОГРИБКОВЫХ СРЕДСТВ НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ И ИММУНОГЛОБУЛИНЫ IN VITRO

Ин-т отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко АМН Украины

В последние десятилетия для целей локальной фармакотерапии при воспалительных заболеваниях в оториноларингологии и стоматологии широко применяются препараты синтетического и растительного происхождения с противовоспалительными и антибактериальными свойствами. Вместе с тем известно, что слизистая оболочка ротовой полости и других отделов верхних дыхательных путей является составной частью системы иммунитета пограничных тканей и может существенно влиять на клетки системы иммунитета в целом (В.П. Быкова, 1999; О.Ф. Мельников, Д.И. Заболотный, 2003). Учитывая изложенное, а также принимая во внимание отсутствие данных о возможном иммуномодулирующем влиянии препаратов данной группы, мы изучили действие отдельных препаратов *in vitro* на некоторые фенотипические и функциональные свойства тканевых иммунокомпетентных клеток нёбных миндалин и на иммуноглобулины класса А и G.

Материал и методы

В качестве объекта изучения были выбраны клетки нёбных миндалин, поскольку при использовании антисептических средств они довольно часто подвергаются их воздействию. Во-вторых, получение значительного количества клеток позволяет проводить широкоплановые исследования на одном их пуле. И наконец, причастность нёбных миндалин к системе мукозального иммунитета (Д.И. Заболотный, О.Ф. Мельников, 1999; В.П. Быкова, 1999) также подчеркивает целесообразность и актуальность такого выбора. Клетки мы получали из удаленных миндалин (не позже, чем

через 1 ч после выполнения тонзиллэктомии) механически (В.В. Кишук, 1996) и содержали их в обогащенной эмбриональной телячьей сывороткой (до 5%) и L-глутамином среде RPMI-1640 (Serva, ФРГ), выдерживая концентрацию 2 млн в 1 мл среды. При проведении исследований с клетками миндалин придерживались рекомендаций, изложенных в работе О.Ф. Мельникова, О.Г. Рыльской (2005).

Вторым объектом для изучения влияния антисептических растворов были стандарты иммуноглобулина класса А в его секреторной и мономерной формах, а также иммуноглобулина класса G (Dako, Дания). Исследовалось влияние антисептических препаратов «Вакодин», «Фитодент», «Корсадил» и антигрибкового препарата «Флюконазол» («Дифлюкан», Pfizer, США) на фенотипическую характеристику клеток миндалин до и после их воздействия. Для этого к 1 мл клеточной взвеси нёбных миндалин (2 млн клеток) добавлялись растворы антисептических средств в конечных разведениях 1:20, 1:40 и 1:200, а «Дифлюкан» – в конечной концентрации 200 и 20 мкг/мл. После часовой инкубации в условиях термостата клетки дважды отмывались питательной средой с помощью центрифугирования при 120 g и вновь взвешивались в среде.

Определялась экспрессия антигенов CD₄ (Т-хелперы), CD₂₅ (активированные лимфоциты), CD₅₆ (естественные киллеры) с использованием моноклональных антител, сорбированных на эритроцитах (метод розеткообразования, реактивы производства Витебского медицинского университета, Беларусь). Наряду с этим, исследовалась

жизнеспособность клеток в пробе с трипановым синим, а также их цитолитическая активность в отношении ксеногенных эритроцитов с помощью спектрофотометрического метода (О.Ф. Мельников, Т.А. Заяц, 1999). От присутствия спирта в препаратах избавлялись ступенчатым выпариванием, помещая их в теплые (45⁰С) фарфоровые чашки.

При изучении влияния антисептических препаратов на иммуноглобулины в виде стандартных растворов последние смешивались поровну с раствором антисептика, разведенного 1:10. Дифлюкан добавлялся в стандарты в конечной концентрации 200 и 20 мкг/мл, и они инкубировались в течение суток в условиях эксикатора при комнатной температуре с соответствующими контролями. Оценивалась концентрация иммуноглобулинов методом радиальной иммунодиффузии по Simmons (1971). Результаты исследований статистически обработаны с

применением непараметрических критериев (Glantz, 2000).

Результаты исследований

Было установлено, что из применяемых препаратов токсичными для клеток нёбных миндалин был «Корсадил» в разведении 1:20 и 1:40 и «Фитодент» в разведении 1:20 (табл. 1). Так, число нежизнеспособных клеток при инкубации с корсадиллом 1:20 увеличивалось более чем в 3 раза через 1 ч совместной инкубации с препаратом (46,7% – в опыте и 13,0% – в контроле), а при инкубации с раствором фитодента в разведении 1:20 их количество составило 18,7%. При снижении концентрации всех исследуемых препаратов (>1:40) токсичность не обнаруживалась ни у одного из них. Токсичность дифлюкана была невысокой – уменьшение числа клеток жизнеспособных на 20% происходило только при концентрации препарата 200 мкг/мл.

Таблица 1

Влияние растворов антисептических препаратов на жизнеспособность клеток нёбных миндалин при совместной инкубации *in vitro*

Исследуемые препараты	Число проб	Количество нежизнеспособных клеток, % (M±m)		
		разведение препаратов		
		1:20	1:40	1:200
Контроль	9	13,0±1,3		
Вакодин	7	14,6±2,1	16,2±3,1	15,2±2,6
Фитодент	7	18,7±1,7*	16,1±1,8	12,5±2,5
Корсадил	7	46,7±7,0**	29,2±2,3*	19,8±3,8
Дифлюкан – 200 мкг/мл	8	14,2±4,1		
Дифлюкан – 20 мкг /мл	8	12,1±2,6		

При изучении влияния растворов антисептиков и дифлюкана на экспрессию различных CD-антигенов на иммунокомпетентных клетках миндалин было установлено, что фитодент в разведении 1:40 способствовал увеличению числа клеток с маркерами Т-хелперов, а корсадил в разведении 1:20 и 1:40 снижал число клеток с маркерами естественных цитотоксических клеток (табл. 2). Действие дифлюкана было неоднозначным и зависело от его концентрации: если она составляла 200 мкг/мл, то содер-

жание активированных клеток (CD₂₅) не изменялось и снижалось (p<0,05) число клеток с маркерами естественных киллеров (CD₅₆). Уменьшение концентрации препарата в 10 раз сопровождалось увеличением в 1,6 раза числа активированных клеток.

Не было выявлено существенного влияния препаратов на функциональную активность естественных цитотоксических клеток нёбных миндалин, за исключением корсадила, инкубация с которым в разведении препарата 1:20 снижала цитотоксиче-

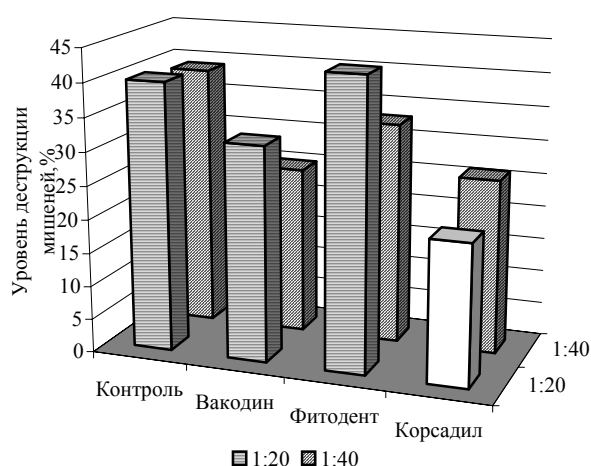
ский потенциал клеток миндалин (рис. 1) в отношении инертных метаболически малоактивных клеток-мишеней. Дифлюкан в

низкой концентрации активировал функциональную активность цитотоксических клеток миндалин почти в 2 раза (рис. 2).

Таблица 2

Влияние различных концентраций препарата на экспрессию поверхностных антигенов на иммуноцитах нёбных миндалин *in vitro*

Исследуемые препараты	Экспрессия поверхностных антигенов								
	CD ₄	CD ₂₅	CD ₅₆	CD ₄	CD ₂₅	CD ₅₆	CD ₄	CD ₂₅	CD ₅₆
	разведение препаратов								
	1:20			1:40			1:200		
Контроль	20,9	9,3	25,9						
Вакодин	23,7	10,1	21,3	22,5	10,5	20,4	20,5	11,4	20,5
Фитодент	21,5	11,9	20,4	30,9*	12,8	17,8	25,5	14,0	19,3
Корсадил	22,0	8,5	12,0*	21,5	13,3	16,2*	20,3	12,5	22,5
Дифлюкан – 200 мкг/мл	20,0±3,3	11,2 ±2,6	8,8± 2,2*						
Дифлюкан – 20 мкг/мл	17,8±3,5	18,3*±3,1	20,0±2,6						



Примечание: белым цветом обозначено достоверное изменение параметра.

Рис. 1. Влияние различных концентраций антисептических препаратов на цитолитическую активность клеток нёбных миндалин.

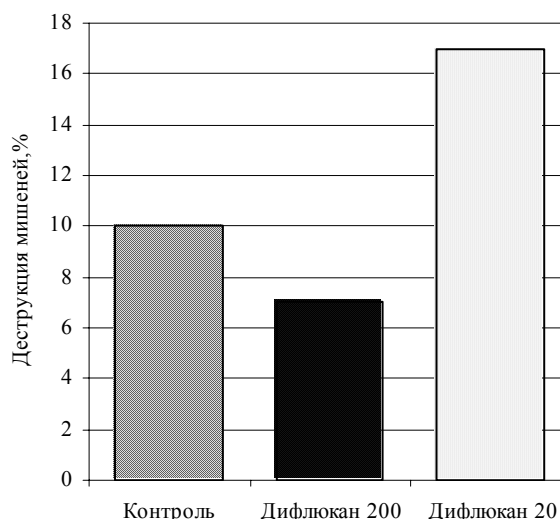


Рис. 2. Влияние дифлюкана на цитолитическую активность клеток нёбных миндалин *in vitro*

Не отмечено выраженного воздействия исследованных антисептиков и дифлюкана на содержание иммуноглобулинов класса А даже при суточном совместном культивировании, однако при использовании корсадила в разведении 1:20 определялось достоверное снижение уровня IgG.

Проведенные исследования позволяют заключить, что среди изучаемых антисепти-

ческих препаратов наиболее токсичным для тканевых иммуноцитов в условиях *in vitro* является «Корсадил». Невысокий уровень изменений в экспрессии фенотипических белков на тканевых иммунокомпетентных клетках свидетельствует о низком уровне иммуотропности исследуемых препаратов, которая более всего выражена в узком интервале концентраций у препаратов «Фитодент»

(стимуляція CD₄-експресії) і «Корсадил» – подавлення числа кліток с маркером естественних кліток-киллеров и функциональной их активності, вероятно, за счет токсичності препарату. Действие противогрибкового препарату «Дифлюкан» было дозозависимым – низкая концентрация его способствовала активации фенотипических и функциональных свойств лимфоцитов миндалин.

Положительным фактом следует считать отсутствие негативного влияния на защитные белки, в том числе и на секретор-

ный иммуноглобулин класса А, который представляет собой важный гуморальный фактор защиты слизистой оболочки верхних дыхательных путей (Brandtzaeg, 1995). Обобщенным выводом работы является то, что в большинстве исследований невысокие концентрации препаратов оказывали выраженный стимулирующий эффект, что необходимо учитывать при местном использовании препаратов при инфекционно-воспалительных заболеваниях ротовой и носовой частей глотки.

1. Быкова В.П. Структурные основы мукозального иммунитета верхних дыхательных путей // Рос. ринология. - 1999. - №1. - С. 5-11.
2. Заболотный Д.И., Мельников О.Ф. Теоретические аспекты генеза и терапии хронического тонзиллита. - К.: Здоров'я, 1999. - 145 с.
3. Кішук В.В. Обґрунтування та ефективність консервативної терапії хворих на хронічний тонзиліт електромагнітним полем та тимчасовими імуномодуляторами: Автореф. дис. ... канд. мед наук (Киевский НИИ отоларингологии). – Киев, 1996. - 20 с.
4. Мельников О.Ф., Заболотный Д.И. Диагностика иммунодефицитов при патологии слизистой оболочки на основе определения иммуноглобулинов в секретах – концепция диагностики иммунодефицитов при патологических процессах в слизистых оболочках. – Киев: Изд. Ин-та отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко АМНУ. – 30 с.
5. Мельников О.Ф., Заяц Т.А. Сравнительное изучение радиоизотопного и спектрофотометрического метода изучения цитолиза клеток // Лаб. диагностика. - 1999. - №5. - С. 43-45.
6. Мельников О.Ф., Рылская О.Г. Экспериментальное исследование иммуномодулирующих свойств Тонзилгона Н in vitro // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. - 2005. - №3. - С. 74-76.
7. Brandtzaeg P. Immunocompetent cells in the upper airway: function in normal & diseased mucosa // Eur. Arch. Otolaryngol. - 1995. - V.252. - P. 8-21.
8. Glantz S. Медико-биологическая статистика. - М.: Практика (пер. с англ.), 2000. - 455 с.
9. Simmons P. Quantitation of plasma proteins in low concentrations using RID // Clin.Chim. Acta. – 1971. - B.35. – P. 53-57.

Поступила в редакцию 26.06.06.

© О.Ф. Мельников, И.С. Зарицкая, Л.А. Позняк, О.Г. Рылская, 2006

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ АНТИСЕПТИЧНИХ ЗАСОБІВ НА ІМУНОКОМПЕТЕНТНІ КЛІТИНИ ТА ІМУНОГЛОБУЛІНИ IN VITRO

Мельников О.Ф., Зарицкая И.С., Позняк Л.А.,
Рылская О.Г. (Київ)

Резюме

Вивчався вплив різних концентрацій антисептичних препаратів „Вакодин”, „Фітодент”, і „Корсадил” на життєздатність клітин піднебінних мигдаликів, експресію CD-антигенів, рівень природної цитотоксичності, а також на зміну вмісту імуноглобулінів в експериментальних системах in vitro. Було виявлено, що вакодил – слабо активний і мало змінював імунологічні параметри імуноглобулінів та клітин; фітодент стимулював експресію на тонзилоцитах CD₄-антигенів, цитотоксичну активність тонзилоцитів і не впливав на вміст імуноглобулінів; для корсадилу була більш токсичною і в широких межах концентрації, що співпадало із зниженням активності природних цитотоксичних клітин; дифлюкан в концентрації 200 мкг/мл виявляв депресивні властивості, при зменшенні концентрації в 10 разів стимулюючий вплив на імунокомпетентні клітини піднебінних мигдаликів. Всі досліджувані препарати не змінювали вмісту у розчині імуноглобулінів класу А та G.

ANTISEPTIC REMEDIES INFLUENCE INVESTIGATION ON THE IMMUNOCOMPETENT CELLS AND ANTIBODIES IN VITRO

Mel'nikov O.F., Zaryzka I.S., Poznyak L.A.,
Ryl's'ka O.G. (Kiev)

Summary

There were conducted investigations of different antiseptic medications concentration influence, such as “Vakodin” and “Korsadil” on the palate tonsils cell viability, SD - antigens expression, natural cytotoxicity level, and also on the antibodies maintenance change in the experimental systems in vitro. There were discovered that “Vakodil” is the week active and changed immunological cells and antibodies characteristics; “Fitodent” promote the expression on the tonsillitis SD₄ - antigens, cytotoxicity tonsillitis activity and have not influenced on the antibodies maintenance; “Korsadil” was more toxic and in the brighter concentration borders that have coincided with the activity lowering of natural cytotoxicity cells; “Dyflukan” in the concentration 200 mkg/ml found negative characteristics, by the concentration decrease in 10 times there was the promotive influence on the immunocompetent palate tonsil cells. All investigative medications do not change the maintenance in the antibodies solution of the A and G class.