

*Д.И. ЗАБОЛОТНЫЙ, О.Ф. МЕЛЬНИКОВ, М. Ю. ГРИЦЕВИЧ,
Е.А. МУРЗИНА, М.Д. ТИМЧЕНКО*

ВЛИЯНИЕ IN VITRO ПРЕПАРАТА «АНГИНОВАГ» НА СТРУКТУРУ ГУМОРАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ ИММУНИТЕТА РОТОГЛОТОЧНОГО СЕКРЕТА У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ФАРИНГИТОМ

*ГУ «Институт отоларингологии им. проф. А.И. Коломийченко НАМН Украины»
(дир. – акад. НАМНУ, проф. Д.И. Заболотный)*

Широкое применение комбинированных антисептиков местного действия в практике отоларингологов предполагает в виде одной из первоочередных задач клинической иммунологии изучение влияния препаратов и их составных на факторы защиты ротоглоточного секрета, прежде всего на иммуноглобулины и различные группы цитокинов, которые в значительной степени определяют состояние локального иммунитета в ротовой части глотки [5, 6, 9, 10].

Новым комбинированным препаратом локального применения является «Ангиноваг» (Ferrer, Испания), который содержит вещества с антиинфектным и противовоспалительным действием, обладает местноанестезирующими свойствами. Такое комплексное применение различных по характеру и направленности влияния веществ в этот препарат априорно предполагает их действие при распылении в области ротовой части глотки на гуморальные защитные структуры ротоглоточного секрета (РГС).

В связи с изложенным представлялось целесообразным исследовать влияние различных доз препарата на гуморальные защитные факторы РГС при прямом воздействии на них *in vitro* с последующей оценкой изменения их концентрации по сравнению с исходным уровнем.

Материал и методы

В качестве тест-объекта использовался нестимулированный РГС от 15 больных острым фарингитом. РГС получен в соответствии с рекомендациями Института отоларингологии НАМН Украины [3]. После фильтрования через стерилизующий фильтр

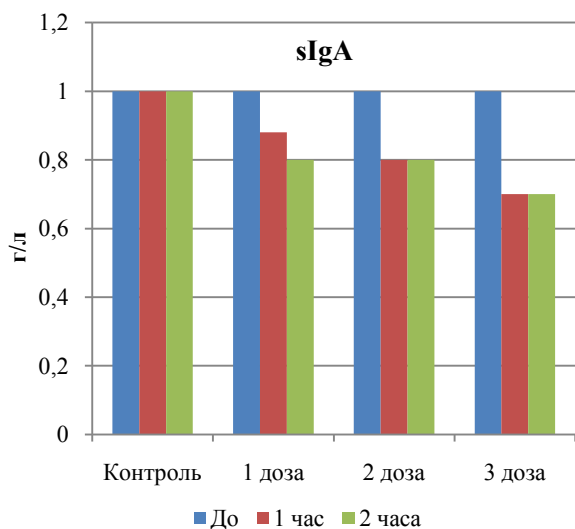
типа Millipore жидкой фазы РГС фильтрат разливался по 0,2 мл в стерильные пробирки за исключением контрольных по 0,2 мл смеси из раствора Хэнкса и различных разведений препарата «Ангиноваг»: 1 – одно впрыскивание препарата в 2 мл раствора Хэнкса, 2 – два впрыскивания в аналогичный объем раствора Хэнкса и 3 – 3 впрыскивания. В контрольную пробирку добавлялось 0,2 мл стерильного раствора Хэнкса. Все пробирки инкубировались в CO₂ термостате Nuve EC-160 (Турция) в течение 1 и 2 часов, после чего определялось содержание в них секреторной и мономерной форм IgA, интерлейкина-1 β , α и γ -интерферонов, лактоферрина и макрофагального воспалительного протеина –MIP-1b.

Исследовалась концентрация секреторного IgA (sIgA) с помощью набора реактивов Хема Медика (РФ), лактоферрина (ООО Вектор-Бест, РФ), интерферонов α и γ (набор реактивов Цитокин, РФ) и провоспалительного цитокина интерлейкина-1 β (наборы фирмы Цитокин), макрофагального воспалительного цитокина MIP-1b (Bioscience, Австрия). Иммуноферментный анализ осуществлялся с использованием линейки приборов с ридером Lab Line (Австрия). Результаты статистически обработаны с применением параметрического критерия «t» Стьюдента [1].

Результаты исследований и их обсуждение

При определении влияния препарата «Ангиноваг» на структуру секреторного IgA было выявлено, что контакт препарата с 1-й дозой существенно не воздействовал на

исходную концентрацию этого иммуноглобулина в течение всего срока наблюдения, тогда как более высокие дозы препарата снижали уровень sIgA в РГС через 2 часа культивирования (рис. 1). Изменения в концентрации мономерной формы IgA (тот же график) были менее значимыми ($p>0,05$).



Препарат «Ангиноваг» не влиял на уровень в РГС α -интерферона при всех дозах препарата и времени инкубации, однако снижал содержание γ -интерферона при более высоких дозах препарата через 2 часа культивирования (табл. 1).

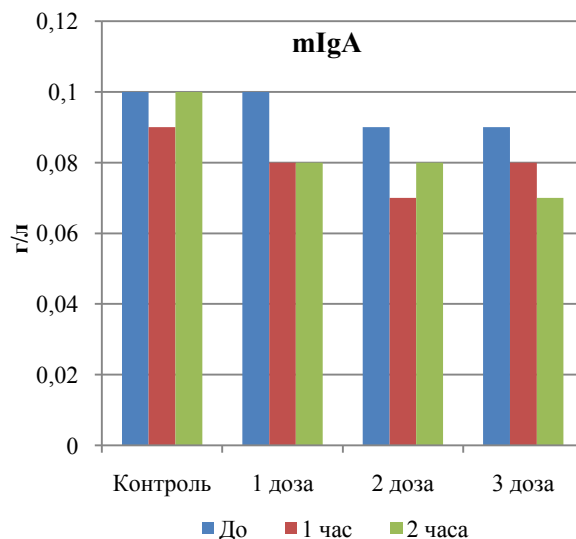


Рис.1. Влияние дозы препарата и времени инкубации на концентрацию секреторной (sIgA) и мономерной (mIgA) форм иммуноглобулина класса А в РГС при культивировании *in vitro*.

Данные по определению действия препарата «Ангиноваг» на уровень в РГС лактоферрина и интерлейкина-1 β представлены в табл. 2. При однократной дозе препарата не выявлено изменений в показателе лактоферрина, а при использовании дозы «2» происходило достоверное снижение

этого продефензина в смеси, равно как и провоспалительного цитокина – интерлейкина-1 β ($p<0,02$). Подобным было действие препарата во всех дозировках на уровень в РГС MIP-1b, который снижался практически в 2,5 раза уже через 1 час культивирования (рис. 2).

Таблица 1

Концентрация интерферонов (α и γ -ИФН) в РГС при контакте с различными дозами препарата «Ангиноваг»

Группы	Концентрация интерферонов, пг/мл			
	1 час		2 часа	
	α -ИФН	γ -ИФН	α -ИФН	γ -ИФН
Контроль (без препарата)	17,5 (6-108)	50,5 (25-124)	21,2 (11-45)	44,8 (23-89)
1 доза препарата	19,4 (10-3)	43,0 (32-140)	16,5 (12-40)	36,5 (25-70)
2 дозы препарата	20,6 (10-55)	33,6 (10-75)	15,5 (3-34)	19,6 (11-75)*
3 дозы препарата	17,8 (11-26)	40,2 (20-56)	16,4(12-34)	15,5 (12-33)**

Обозначения : * $p<0,05$ по отношению к контролю.

Концентрация лактоферрина и интерлейкина-1 β в РГС
через 1 и 2 часа культивирования с различными дозами препарата «Ангиноваг» in vitro

Группы (n=15)	1 час 2 часа			
	лактоферрин, нг/мл	интерлейкин-1 β , пг/мл	лактоферрин, нг/мл	интерлейкин-1 β , пг/мл
Контроль (без препарата)	277,5 (46-308)	80,5 (25-120)	231,2 (62-325)	97,5 (35-215)
1 доза препарата	249,4 (50-331)	53,0 (13-80)	165,5 (69-288)	65,5 (25-240)
2 дозы препарата	210,6 (70-295)	33,6 (10-55)*	190,5 (34- 260)	35,6 (11-55)*
3 дозы препарата	189,5 (75- 265)	26 (10-45)**	128,5 (47-270)*	21,2 (0-76)**

Обозначения: * p<0,05 по отношению к контролю; ** p<0,02.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что при длительном контакте ротоглоточного секрета с препаратом «Ангиноваг» могут происходить изменения в содержании как защитных, так и провоспалительных факторов, в основном при высоких дозах препарата и длительном контакте (>1 часа). Если учесть тот факт, что «Ангиноваг» в составе ротоглоточного секрета контактирует с гуморальными и клеточными факторами в течение нескольких минут [7], то условия длительности контакта факторов РГС in vitro с компонентами препарата значительно завышены. Однако даже при столь длительном прямом контакте (1 час) «Ангиноваг» не изменял существенно уровня защитных факторов – секреторного IgA, лактоферрина и α -интерферона, а также существенно снижал концентрацию провоспалительных факторов (интерлейкин-1 β , МiP-1b), что, согласно существующим представлениям, является важным положительным прогностическим фактором в оценке эффективности противовоспалительной терапии [2, 4, 7]. По всей вероятности, препарат может оказывать прямое деструктивное действие на структуру регуляторных пептидов (цитокинов), что согласуется с результатами изучения влияния препарата «Ангиноваг» на клетки миндалин в условиях in vitro [7].

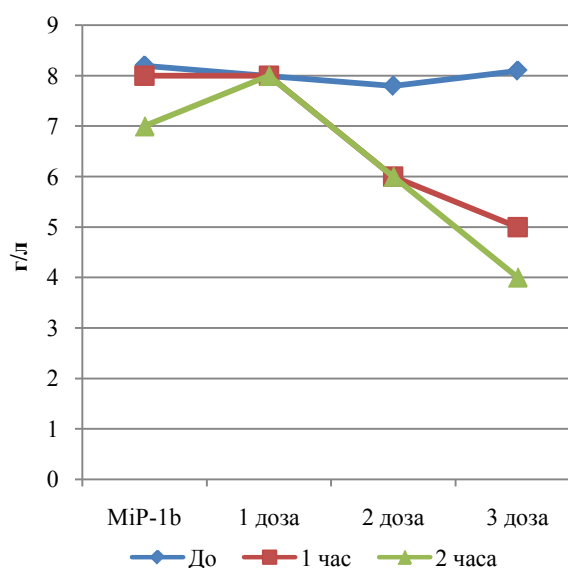


Рис. 2. Уровень цитокина МiP-1b в РГС до и после контакта in vitro с различными дозами препарата.

Выводы.

1. Препарат «Ангиноваг» в пределах концентраций, рекомендованных изготовителем, не оказывал токсического влияния на защитные факторы ротоглоточного секрета при культивировании in vitro.

2. Препарат оказывал прямое деструктивное действие на защитные и провоспалительные факторы ротоглоточного секрета в зоне высоких доз и длительного контакта.

Литература

1. Гублер Е.В. Математические методы анализа и распознавания патологических процессов – Л.: Медицина, 1978. – 294 с.
2. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследований уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление. – 2003. – Т.2, №3. – С. 20-29.
3. Заболотний Д.Д., Мельников О.Ф., Тимченко С.В., Заболотна Д.Д. Дослідження ротоглоткового секрету у хворих на хронічні запальні та алергічні захворювання верхніх дихальних шляхів / Метод. рекомендації. – Киев, 2008. – 28 с.
4. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 640 с.
5. Мельников О.Ф., Заболотный Д.И. Диагностика иммунодефицитов при патологии слизистой оболочки на основе определения иммуноглобулинов в секретах (концепция) / Мет. пособие. – Киев, 2003. – 30 с.
6. Мельников О.Ф. Концепция диагностики иммунной недостаточности на основе определения защитных белков в секретах / О.Ф. Мельников, Д.И. Заболотный, В.И. Шматко, А.Ю. Бредун // Иммунологія та алергологія. – 2011. - № 1. – С. 3-7.
7. Мельников О.Ф. Влияние препарата Ангиноват на показатели местного иммунитета в ротовой части глотки у лиц с хроническими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей / О.Ф. Мельников, М.Д. Тимченко, А.А. Бурлаченко, А.А. Цимар, Э.А. Мурзина // Журн. вушних носових і горлових хвороб. – 2013. – №2. – С. 36-39.
8. Полтырев С.В. Патологическая физиология пищеварения // Руководство по патологической физиологии. – Л.: Наука. – 1966. – Т.3. – С. 10-12.
9. Brandtzaeg P. Immunology of tonsils and adenoids // Intern. J. Pediatric Otorhinolaryngology. – 2003. – 6751. – P. 569-576.
10. Ogasamara N. Respiratory airway // The 8-th Int. symp. of Tonsils & mucosal Barriers of the Upper Airways. – Zurich. – 2013. – Abstr.14.

References

1. Gubler EV. Mathematical methods of analysis and detection of pathological processes. Leningrad: Meditsina; 1978. 294 p. Russian.
2. Dem'ianov AV, Kotov AIu, Simbirtsev AS. Diagnostic value of cytokine levels in clinical practice. Tsitokiny i vospalenie. 2003;2(3):20-9. Russian.
3. Zabolotnij DD, Mel'nykov OF, Tymchenko SV, Zabolotna DD. Research of oropharyngeal secretions of patients with chronic inflammatory and allergic diseases of the upper respiratory tract. Method recommendations. Kiev; 2008. 28 p. Ukrainian.
4. Koval'chuk LV, Gankovskaia LV, Meshkova RIa. Clinical Immunology and Allergology with the basics of Immunology. Moskow: GEOTAR-Media; 2011. 640 p. Russian.
5. Mel'nikov OF, Zabolotnyi DI. Diagnosis of immunodeficiency in the pathology of the mucous membrane on the basis of determination of immunoglobulins in secretions (concept). Kiev; 2003. 30 p. Russian.
6. Mel'nikov OF, Zabolotnyi DI, Shmatko VI, Bredun AIu. The concept of diagnosis of immune deficiency based on the definition of protective proteins in the secretions. Immunologija ta alergologija. 2011;(1):3-7. Russian.
7. Mel'nikov OF, Timchenko MD, Burlachenko AA, Tsimar AA, Murzina EA. Anginovag effect of the drug on local immunity in the oropharynx in patients with chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract. Zhurnal vushnyh, nosovyh i gorlovyh hvorob. 2013;(2):36-9. Russian.
8. Poltyrev SV. Pathological physiology of digestion. Pathophysiology Guide. Vol. 3. Leningrad: Nauka; 1966. P. 10-12. Russian.

Поступила в редакцию 30.09.15.

© Д.И. Заболотный, О.Ф. Мельников, М. Ю. Грищевич, Е.А. Мурзина, М.Д. Тимченко, 2015

ВПЛИВ IN VITRO ПРЕПАРАТА «АНГІНОВАГ» НА СТРУКТУРУ ГУМОРАЛЬНИХ ФАКТОРІВ ІМУНІТЕТУ РОТО ГЛОТКОВОГО СЕКРЕТА У ХВОРИХ НА ГОСТРИЙ ФАРИНГІТ

Заболотний Д.І., Мельников О.Ф., Грицевич М.Ю., Мурзина О.А., Тимченко М.Д. (Київ)

А н о т а ц і я

Мета роботи. Комбінованим препаратом локального застосування є «Ангіноваг» (Іспанія), який містить речовину з антиінфектними та протизапальними якостями, володіє місцевоанестезуючою дією. Таке комплексне використання різних за характером і направленістю впливу речовин в препараті апріорно припускає їх дію на гуморальні захисні структури ротоглоткового секрету (РГС) при його розпиленні в ділянці ротової частини глотки.

Матеріали та методи. В роботі застосовувався в якості тест-об'єкту РГС від 15 хворих на гострий фарингіт. Після фільтрування через стерилізуючий фільтр за типом Millipore рідкої фази РГС до фільтрату додавались різні розведення препарату «Ангіноваг» і культивувались при 37⁰С протягом 1 та 2 годин, після чого визначався вміст секреторної і мономерної форм ІgА лактоферрина, інтерлейкіна 1, альфа- і гамма-інтерферонів, а також фактора MIP-1b з використанням IFA методів. Статистична обробка проведена за допомогою критерія «t» Ст'юдента.

Результати. Препарат «Ангіноваг» в межах концентрацій, рекомендованих виробником, не викликає токсичної дії на захисні фактори ротоглоткового секрету при культивуванні in vitro. Препарат мав прямий деструктивний вплив на захисні та прозапальні фактори ротоглоткового секрету в межах високих доз та при тривалому контакті.

Висновки. Отримані результати свідчать про необхідність підбору імуномодуляторів при комплексному лікуванні хворих з гіпертрофією глоткового мигдалика.

Ключові слова: гуморальні фактори імунітету глотки, локальний антисептик in vitro.

«ANGINOVAG» IN VITRO EFFECT ON THE STRUCTURE OF HUMORAL IMMUNITY FACTORS OF OROPHARYNGEAL SECRETIONS IN PATIENTS WITH ACUTE PHARYNGITIS

Zabolotnyi D.I., Melnikov O.F., Hrytsevych M.Y., Murzyna A.A., Timchenko M.D.

State institution «O.S. Kolomiychenko Institute of Otolaryngology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»; e-mail: amtc@kndio.kiev.ua

Abstract

Aim. To study "Anginovag" comined local drug effects on humoral protective structures of oropharyngeal secretions (OPS) after its spraying in the mouth area of the pharynx.

Materials and methods. We used OPS of 15 patients with acute pharyngitis as a test object. Liquid phase of OPS after filtering through a sterilizing Millipore filter has been added to the different dilutions of "Anhinovah" and cultured at 37⁰C for 1 and 2 hours. Then we determined the content of secretory IgA and monomeric forms of lactoferrin, interleukin 1, alpha and gamma interferon and MIP-1b factor using IFA methods. Statistical analysis was performed using the Student's t-criterion.

Results. «Anhinovah» within concentrations recommended by the manufacturer, does not cause toxic effects on the oropharyngeal protective factors when cultured in vitro. The drug had direct destructive impact on the protective and proinflammatory factors of oropharyngeal secretions within high doses and prolonged contact.

Keywords: humoral immunity factors of pharynx, local antiseptic in vitro.