

К.А. Масуев, Е.А. Сиротин, Е.А. Лимаренко

ДВОЙНОЕ СЛЕПОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФОСФОЛИПИДНЫХ ЛИПОСОМ В ЛЕЧЕНИИ БРОНХООБСТРУКТИВНОГО СИНДРОМА

НИИ пульмонологии МЗ РФ, Москва

THE DOUBLE-BLIND STUDY OF THE PHOSPHOLIPIDAL LIPOSOME'S EFFECTIVITY IN TREATMENT OF BRONCHOOBSTRUCTIVE SYNDROME.

К.А. Masujev, Е.А. Sirotin, Е. А. Limarenko

S u m m a r y

The study of the liposomal remedy for inhalational application named as Lipin was carried out in two groups of patients with various forms of bronchoobstructive diseases (bronchial asthma, chronic obstructive bronchitis). The remedy was diluted ex tempore with saline and was dispersed by the ultrasound inhalator. 9 patients comparable in sex, age, the disease duration, with the general group of the patients were inhaled with saline and were as a control. To estimate the influence of the liposomal remedy on the hyperreactivity of the bronchial tree the supplemental study in 12 patients aged 18 years with bronchial asthma (BA) in the remission was carried out. The hyperreactivity syndrome was diagnosed on results of bronchial challenge with metacholine. The obtained results allow to testify about the greatest efficacy of the remedy in the group of patients with BA and in cases when the bronchial conductivity disturbance is formed by obstruction on distal and intermediate levels of bronchi especially. Most nonsatisfactory results were obtained in patients with obstructive bronchitis. The preliminary inhalation with phospholipidal liposomes, as well as the 6 day course medication, allows to diminish essentially the metacholinic reactivity of the airway

Р е з ю м е

В двух группах больных с различными формами бронхообструктивных заболеваний легких (бронхиальная астма и хронический гнойно-обструктивный бронхит) проведено исследование эффективности липосомального препарата Липин для ингаляционного применения. Препарат разводился ex tempore физиологическим раствором и применялся с помощью ультразвукового ингалятора. В качестве контроля у 9 больных бронхиальной астмой (БА), сопоставимых по возрасту, полу, длительности заболевания с основной группой пациентов, проводились ингаляции изотонического раствора хлорида натрия. Для оценки влияния липосомального препарата на гиперреактивность бронхиального дерева проведено дополнительное обследование у 12 лиц призывного возраста, больных БА и находящихся в стадии стойкой ремиссии. Синдром гиперреактивности диагностировался по результатам провокационного тестирования с метахолином. Полученные результаты позволяют утверждать о наибольшей эффективности препарата в группе больных с БА, особенно в тех случаях, когда нарушения бронхиальной проходимости формируются за счет нарушения проходимости на уровне мелкого и среднего калибра бронхов. Наименее удовлетворительные результаты получены у пациентов с гнойно-обструктивным бронхитом. Предварительная ингаляция фосфолипидных липосом, равно как и 6 дневный курсовой прием, позволяет существенно уменьшить реактивность дыхательных путей на метахолин.

В настоящее время для лечения бронхо-обструктивного синдрома традиционно применяются адrenomиметики, производные теофиллина, глюкокортикостероидные гормоны. Хорошо известны преимущества и недостатки этих препаратов. В то же время продолжается поиск новых лекарственных средств, способных воздействовать на процессы воспаления в дыхательных путях, гиперреактивность бронхов. Одним из таких перспективных методов лечения, возможно, окажется применение липосом, как самостоятельно, так и в качестве носителей различных лекарственных форм.

Липосомы представляют собой сферические везикулы с одним или несколькими бислоями, получаемые при воздействии ультразвука на липиды, в частности фосфолипиды, в водной среде. Интерес к липосомам связан с их способностью взаимодействовать с плазматическими мембранами клеток и видоизменять вследствие этого их физико-химические свойства,

влиять на содержание холестерина, текучесть и другие параметры мембраны [2,3]. Уникальны свойства липосом как носителей лекарственных веществ, позволяющие включать в их водное пространство различные водорастворимые, а в липидный кислот — водонерастворимые препараты, снижая таким образом их токсичность и повышая продолжительность действия в организме [5]. Подбирая соотношение липидов в оболочке липосом, размер, полярность (заряд мембраны), можно добиться проникновения их внутрь клеток через плазматические мембраны и внутриклеточного высвобождения содержимого (направленный транспорт лекарств). Важным свойством липосом при ингаляционном применении является способность изменять функциональное состояние сурфактантной системы легких. Роль сурфактанта в развитии бронхообструктивного синдрома до конца не ясна, однако в ряде исследований показано снижение продукции сурфактанта при обструктивных заболе-

Клиническая характеристика обследуемых больных БА

Характеристика больных	1-я группа	Контрольная группа
Возраст	55 (42 — 68)	51 (40 — 62)
Пол		
М	13	5
Ж	10	4
Форма астмы		
инфекционно-зависимая	12	4
атопическая	7	3
смешанная	3	2
аспириновая	1	—
Степень тяжести		
тяжелая	9	3
средняя	9	4
легкая	5	2
Степень ДН		
I	10	3
II	9	3
III	4	2
Базисная терапия		
кортикостероидные гормоны	20	6
ингаляции бета-2-агонистов	23	9
метилксантины	23	9

ваниях легких [9]. 80% липидного состава сурфактанта составляет фосфатидилхолин. Поскольку сурфактант является основным структурным компонентом, поддерживающим физиологический тонус терминальных бронхов и альвеол, заместительная терапия сурфактанта фосфолипидными липосомами может повлиять и на состояние бронхиальной проходимости.

Изложенное послужило обоснованием для клинического применения в двойном слепом исследовании липосомального препарата липин, изготовляемого из природного фосфатидилхолина. Препарат разработан в НИИ биохимии АН Украины им. А.В.Палладина (В.С.Стефанов).

Липосомальный препарат липин применен в комплексном лечении у 31 больного с различными формами обструктивных поражений легких в возрасте 42—68 лет (18 мужчин и 13 женщин). 1-ю группу обследуемых составили 23 больных бронхиальной астмой (БА), среди которых инфекционно-зависимая форма БА установлена у 12, атопическая — у 7, смешанная — у 3 пациентов и в 1 случае диагностирована аспириновая форма БА. У 10 пациентов диагностирована I ст. дыхательной недостаточности (ДН), у 9 — II, и у 4 — III ст. ДН. 20 из 23 пациентов в качестве базисного получали лечение глюкокортикостероидными гормонами в дозе 10—15 мг/сут. Все больные находились в фазе выхода из обострения.

Препарат липин применялся ингаляционно с помощью ультразвукового ингалятора «Disonic» в дозе 10—15 мг сухого вещества на 1 кг массы больного ежедневно или через день. Непосредственно перед ингаляцией препарат разводился в 10 мл изотонического раствора хлорида натрия. Средняя курсовая доза составила 6—8 г препарата, продолжительность курса

7—12 дней. Продолжительность одной ингаляции 10—15 мин.

В качестве контроля проводились ингаляции 10 мл изотонического раствора хлорида натрия по аналогичной схеме у 9 больных БА, сопоставимых по полу, возрасту, тяжести заболевания с основной группой пациентов (табл. 1).

8 пациентов в возрасте 46—64 лет (средний возраст 55 лет), страдающих тяжелым гнойно-обструктивным бронхитом, составили 2-ю группу обследуемых. Среди них с I ст. ДН было 3 больных, со II — 4 и с III — 1 больной. В качестве базисной терапии 5 больных получали кортикостероидные гормоны, 8 — метилксантины и 7 — антибиотики.

Контроль за изменением функции внешнего дыхания (ФВД) осуществлялся до и после окончания курсового лечения липином по данным кривой «поток—объем», показателей бодиплетизмографии (на аппаратуре фирмы «Erich Jaeger», ФРГ), парциального напряжения в артериальной крови кислорода и углекислоты (pO_2 и pCO_2). Проводился лабораторный контроль за изменением биохимических параметров крови — уровнем фосфолипидов, холестерина и билирубина сыворотки крови, активности АСТ, АЛТ в ходе лечения. Иммунологический контроль включал исследование IgA, IgM, IgG методом радиальной иммунодиффузии по Mancini, общего IgE методом RAST. Кроме того, в 1-й группе пациентов в первый день исследования изучалось непосредственное бронхолитическое действие препарата липин по данным кривой «поток—объем» через 30 и 60 мин после ингаляции.

Для выяснения влияния липосомального препарата липин на гиперреактивность бронхов, являющуюся облигатным признаком БА, дополнительно было обследовано 12 юношей призывного возраста (от 16 до 18 лет) в стадии стойкой ремиссии. Длительность заболевания составила от 8 месяцев до 12 лет. Атопическая форма БА диагностирована у 8 человек, инфекционно-зависимая — у 4. Уровень общего IgE колебался от 14 до 344 ед (в норме до 140 ед.). Синдром гиперреактивности диагностировался по результатам провокационного теста с метахолином. После спонтанного восстановления бронхиальной проходимости (в среднем через 3 часа после завершения провокационного теста) пациенту проводился сеанс ингаляционной терапии липином (10 мг/кг массы тела в форме мелкодисперсного аэрозоля) с помощью ультразвукового ингалятора. Через час после лечебной процедуры проводилась повторная провокация метахолином. Последующие двое суток пациенты получали аналогичные сеансы ингаляционной терапии липином. Эффект от курсового лечения оценивался на четвертые сутки от начала исследования и не менее чем через 24 часа после последней ингаляции.

Исследование проводилось с использованием комплекса Masterlab фирмы «Erich Jaeger» (ФРГ), оснащенного автоматической системой для проведения провокационных тестов с прерывистой подачей аэрозоля на вдохе. Первичная провокация проводилась по индивидуальной для каждого пациента схеме, которой придерживались при повторных тестированиях.

Бронхоконстрикторный эффект метахолина одновременно оценивался по трем показателям:

объем форсированного выдоха за 1-ю секунду (FEV_1 , мл),

Таблица 2

Динамика бронхиальной проходимости у больных 1-й группы (n = 17) через 30 и 60 мин после ингаляции липина

Показатель	Исходно	Через 30 мин после ингаляции	Через 60 мин после ингаляции
Rtot	0,96 ± 0,21	0,98 ± 0,34	0,93 ± 0,29
FEV ₁ , л	1,69 ± 0,32	1,83 ± 0,39	1,78 ± 0,31
MEF ₂₅ , л/с	2,81 ± 0,31	2,85 ± 0,3	2,8 ± 0,28
MEF ₅₀ , л/с	1,12 ± 0,27	1,21 ± 0,35	1,20 ± 0,32
MEF ₇₅ , л/с	0,44 ± 0,145	0,53 ± 0,27	0,52 ± 0,3

максимальный поток при форсированном выдохе на уровне 50% ФЖЕЛ (MEF₅₀, мл/сек)

общее сопротивление дыхательных путей (R tot, кПа/л/сек).

С помощью компьютерной программы «ProTest» (разработчик Е.А.Лимаренко, НИИ пульмонологии МЗ РФ) выстраивалась кривая «доза—эффект», рассчитывалась провокационная доза (PD) медиатора, количественно оценивалась чувствительность (Sensitivity) и реактивность (Reactivity) бронхиального дерева.

Чувствительность оценивалась как доза медиатора, выводящая мониторируемый показатель за пределы его естественной воспроизводимости. Реактивность оценивалась по средней скорости приращения бронхоконстрикторного эффекта в интервале доз от порога чувствительности до провокационной.

Анализируя полученные результаты, можно высказаться о неоднозначности эффекта ингаляционного липосомального препарата липин у различных больных с бронхообструктивным синдромом. Непосредственным бронхолитическим действием липосомы не обладают. Статистически значимых изменений в показателях ФВД через 30 и 60 мин после ингаляции по сравнению с исходными данными не зарегистрировано (табл.2). Наилучшие результаты курсового лечения получены у больных с БА (1-я группа больных). Практически у всех пациентов данной группы, независимо от формы БА, после шести ингаляций препарата отмечалось улучшение отхождения мокроты, субъективно — ощущение более свободного дыхания, урежение приступов удушья. В

одном случае у больной со смешанной формой БА в 1-й день после ингаляции липина наблюдалось значительное увеличение отхождения мокроты — до 50 мл/сут., которое при последующих ингаляциях не наблюдалось. Улучшение состояния выражалось и в значительном снижении потребности в ингаляционных бронхолитиках. Анализируя изменения ФВД после проведения курсового лечения липином (табл.3), можно заключить, что наиболее эффективным препарат оказался у больных БА с развившейся обструктивной эмфиземой легких, у которых нарушение бронхиальной проходимости формировалось в основном за счет нарушения проходимости на уровне мелких и средних бронхов. На показатели проходимости на уровне крупных бронхов (MEF₂₅) препарат практически не оказывал влияния. Весьма важным параметром, отражающим проявление десенсилизации бета-адренергической рецепции, является реакция бронхиального дерева на симпатомиметики — ингаляционная проба с беротеком. После курсового лечения липином в 1-й группе обследуемых больных наблюдалось достоверное увеличение прироста на беротек показателей ФВД в среднем на 50—60%. Кроме того, в данной группе можно заметить полное или почти полное исчезновение признаков снижения эластичности легочной ткани: раннего экспираторного коллапса (по данным петли «поток—объем») и гистерезиса фазы выдоха (по данным петли «поток—давление»). В ходе лечения имелась тенденция к нормализации соотношения рО₂/рСО₂, однако эти изменения характера статистической значимости не носили (p>0,05) (табл.4).

Возможность снижения базисной терапии при БА является важной характеристикой испытуемого препарата. На фоне лечения липином у 4 пациентов удалось отменить таблетированные гормональные препараты и перевести их на ингаляционный прием стероидов. 8 больным поддерживающая доза стероидов была снижена до 5 мг преднизолона, а 6 пациентам — с 15 мг снижена до 10 мг.

Из побочных эффектов следует отметить небольшой ирритативный кашель и легкое першение в горле при первой ингаляции у 18 больных, которые особого беспокойства пациентам не доставляли и в последующем проходили самостоятельно. Аллергических реакций ни в одном из наблюдений не зарегистрировано.

Результаты обследования в контрольной группе, получавших ингаляции изотонического раствора

Таблица 3

Динамика показателей ФВД и пробы с беротеком после курса терапии липином у больных бронхиальной астмой (n = 23)

Показатель	До лечения		После лечения	
	Исходно	Реакция на беротек	Исходно	Реакция на беротек
R tot, кПа/л/с	0,96 ± 0,21	0,89 ± 0,19	0,62 ± 0,22*	0,46 ± 0,19*
FEV ₁ , л	1,69 ± 0,32	1,74 ± 0,21	2,29 ± 0,27*	3,2 ± 0,37*
MEF ₂₅ , л/с	2,81 ± 0,31	2,94 ± 0,27	3,22 ± 0,28	3,4 ± 0,31
MEF ₅₀ , л/с	1,12 ± 0,27	1,2 ± 0,14	2,06 ± 0,22**	2,78 ± 0,18**
MEF ₇₅ , л/с	0,44 ± 0,145	0,48 ± 0,2	0,79 ± 0,18**	0,96 ± 0,2**

Примечание. Звездочка — p < 0,05, две звездочки — p < 0,01.

Таблица 4

Изменение показателей газообмена у больных 1-й группы после терапии липином (n = 11)

Показатель	До лечения	После лечения
pCO ₂ , мм рт. ст.	47,1 ± 2,0	44,3 ± 2,5
pO ₂ , мм рт. ст.	74,2 ± 1,4	80,5 ± 3,1
SAT,	94 ± 0,3	95,2 ± 0,6
P50,	28,7 ± 0,2	27,5 ± 0,1

хлорида натрия, следующие. После 1-й ингаляции раствора у двух пациентов развился приступообразный кашель, приведший к затрудненному дыханию, для купирования которого пришлось прибегнуть к ингаляции симпатомиметиков. В последующем они отказались от ингаляций. В табл.5 представлены данные исследования ФВД после завершения плацебо — ингаляций. Субъективно пациенты контрольной группы не могли отметить каких-либо положительных сдвигов в своем состоянии, за исключением некоторого улучшения отхождения мокроты после ингаляций. Суточная доза принимаемых бронхолитиков, кортикостероидных гормонов практически не изменилась.

Следует отметить, что малоэффективным оказалось применение липина при тяжелом гнойном поражении бронхов, хотя в литературе и имеются указания об иммуноадапвантном действии липосом [7] (табл.6).

На рис.1 представлены результаты первичного провокационного тестирования пациентов до и после ингаляции липина. Через час после ингаляции липина наблюдалось значительное снижение бронхоконстрикторного ответа на повторную провокацию метахолином. У всех пациентов отмечалось увеличение провокационной дозы по всем трем мониторируемым показателям. Средний прирост PD₂₀ FEV₁ составил 134%, PD₁₀₀ Rtot = 60%, PD₄₅ MEF₅₀ = 121%. Выявленная тенденция не имела статистически значимого подтверждения только для показателя Rtot вследствие его высокой внутригрупповой вариабельности.

Статистически достоверно снизилась реактивность бронхиального дерева в среднем на 40% (рис.2). Тенденция изменения чувствительности не имела статистической значимости (рис.3).

Все описанные для острого теста закономерности сохранялись и после курса ингаляционной терапии

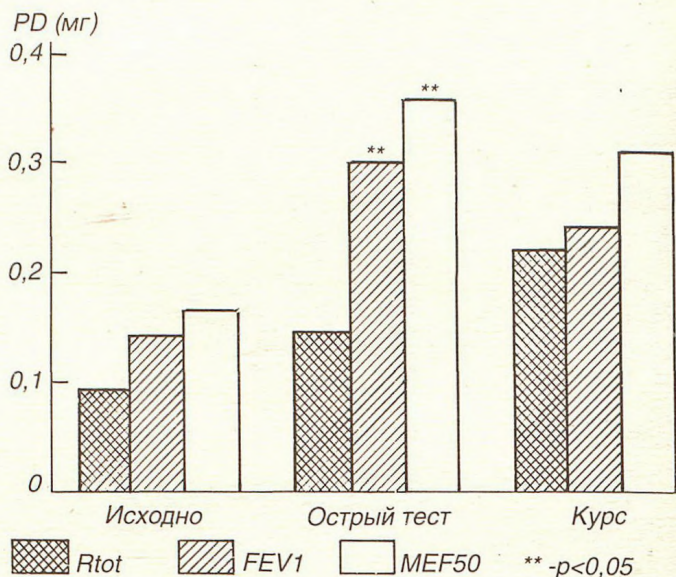


Рис. 1. Динамика провокационной дозы под действием липина.

липидом, однако эффект был менее выражен и статистически не достоверен.

Таким образом, применение липосомального препарата липин в комплексной терапии больных БА оказывает положительное влияние на клиническую картину заболевания. Эффект липина при бронхообструктивном синдроме, видимо, объясняется не только заместительной терапией системы сурфактанта, но и его способностью взаимодействовать с мембранами клеток. Как установлено многими исследователями [1,4], ключевой мембранный фермент аденилатциклаза является строго липидзависимым. Его активность в клеточной мембране критически зависит от липидного микроокружения. Удаление в эксперименте 40—50% фосфолипидов плазматической клеточной мембраны с помощью различных детергентов приводит практически к полной утрате чувствительности аденилатциклазы к стимулирующему действию гормонов (в том числе и адреналина) при неизменном числе бета-2-адренергических рецепторов. С этим положением тесно смыкается понятие «гетерологической десенситизации» адренорецепторов, когда изменения касаются не только и даже не столько самих рецепторов, а в первую очередь нарушается проведение сигнала с

Таблица 5

Динамика ФВД после плацебо-ингаляций изотонического раствора хлорида натрия (n = 7)

Показатель	До лечения	После лечения
Rtot, кПа/л/с	0,89 ± 0,2	0,82 ± 0,3
MEF ₂₅ , л/с	2,86 ± 0,36	3,15 ± 0,25
MEF ₅₀ , л/с	1,84 ± 0,37	1,97 ± 0,23
MEF ₇₅ , л/с	0,54 ± 0,21	0,61 ± 0,18

Таблица 6

Динамика показателей ФВД после лечения липином в группе больных хроническим гнойно-обструктивным бронхитом (n = 8)

Показатель	До лечения	После лечения
Rtot, кПа/л/с	0,90 ± 0,67	0,81 ± 0,56
FEV ₁ , л	2,94 ± 0,59	3,5 ± 0,78
MEF ₂₅ , л/с	2,08 ± 0,71	2,34 ± 0,46
MEF ₅₀ , л/с	1,75 ± 0,81	1,93 ± 0,85
MEF ₇₅ , л/с	0,56 ± 0,74	0,67 ± 0,89

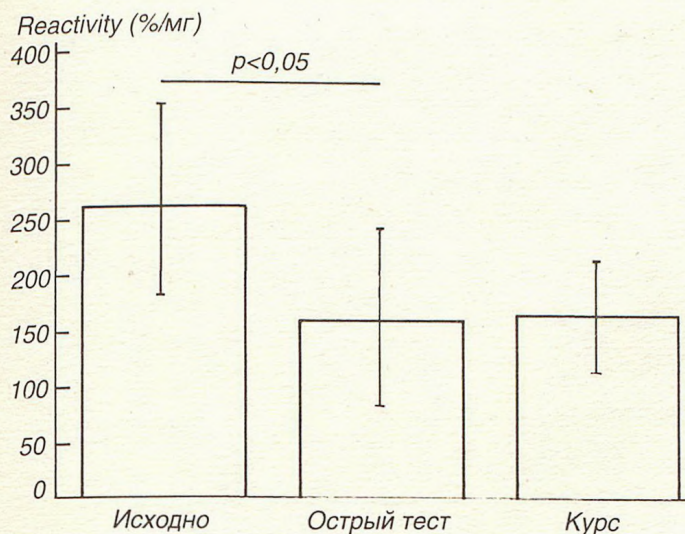


Рис. 2. Динамика реактивности под действием липина.

активированного рецептора на ферментативную субъединицу аденилатциклазы. Добавление мембранных липидов с помощью липосом в эксперименте восстанавливает утраченную чувствительность фермента к гормонам. Согласно современной концепции патогенеза БА, в основе гиперреактивности дыхательных путей лежат процессы воспаления с участием липидных медиаторов клеток (лейкотриены, фактор активации тромбоцитов ФАТ и др.). Субстратом для образования липидных медиаторов является арахидоновая кислота, отщепляемая при активации клетки от фосфолипидов клеточных мембран фосфолипазой А2 и С. Основным источником арахидоновой кислоты в плазматической мембране служат фосфатидилхолин и фосфатидилинозитол, а предшественником одного из главных медиаторов воспаления — ФАТ — является лизо-фосфатидилхолин, также образуемый под действием ферментов фосфолипазы А2 и С. Клетки, поддерживающие персистирующее воспаление в дыхательных путях (альвеолярные макрофаги, эозинофилы, тучные клетки и др.), стимулированные ФАТ, освобождают арахидоновую кислоту из фосфолипидов, замыкая таким образом порочный круг. Длительное воздействие ФАТ, по мнению M. Bachelet et al. [8], может привести к истощению пула фосфатидилхолина в плазматической мембране и является одной из причин десенсилизации бета-рецепторов. Способность фосфолипидных липосом при ингаляционном применении восстанавливать «истощенный» пул фосфатидилхолина в плазматических мембранах различных клеток дыхательных

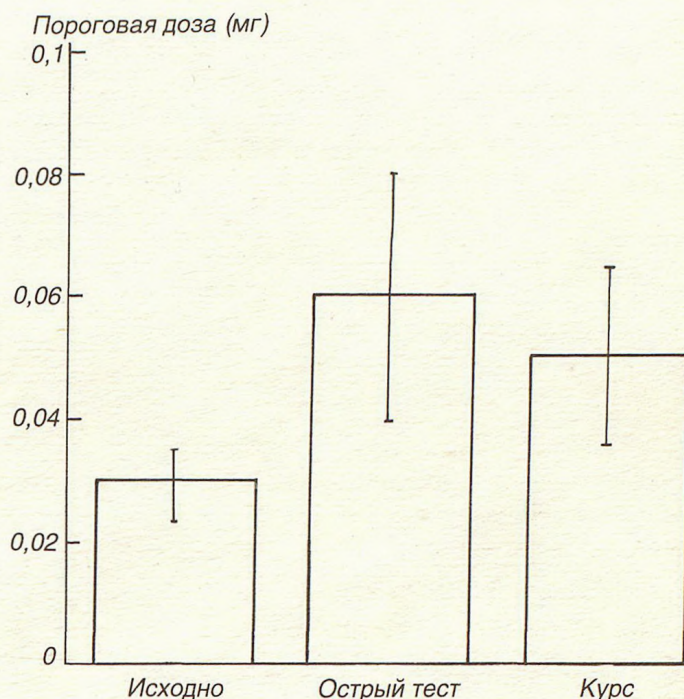


Рис. 3. Динамика чувствительности под действием липина.

путей и повышать таким образом их чувствительность к симпатомиметикам, возможно, играет определенную роль в механизмах положительного влияния препарата липин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бурлакова Е.Б., Архипова Г.В., Молочкина Е.М. Мембрана как интегратор клеточного метаболизма // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы докладов. — М., 1986. — Т.2. — С.181—182.
2. Марголис Л.Б., Бергельсон А.Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. — М.: Наука, 1986.
3. Несытова Н.Ю., Палева Н.С., Ильина Е.В. Тенденции в развитии исследований в области липосом (обзор патентной литературы) // Вестн. АМН СССР. — 1990. — №6. — С.8—19.
4. Саатов Т.С. Роль мембранных липидов в механизме рецепции гормонов // Всесоюзный биохимический съезд, 5-й: Тезисы докладов. — М., 1986. — Т.1. — С.222—223.
5. Чучалин А.Г. Липосомы в медицине // Вестн. АМН СССР. — 1990. — №6. — С.3.
6. Audera C., Ramirez J., Soler E., Carreira J. Liposomes as adjuvants in allergy immunotherapy // Alltologie. — 1989. — Sondernum. Abstr. — P.109—110.
7. Bachlet M., Masliah J., Vartaftig B.B. Changes induced by PAF-acether in diacyl and ether phospholipids from guinea-pig alveolar macrophages // Biochim. Biophys. Acta. — 1986. — Vol.878. — P.177—183.
8. Goran E. Asthma, a condition of surfactant deficiency // Surfactant and Respiratory Tract. — Amsterdam, 1989. — P.273—281.

Поступила 25.01.93.