

## Эффективность применения пульмозима в комплексном лечении муковисцидоза

Л. М. Сергеева

ГОУ ВПО УГМА Росздрава, кафедра детских болезней лечебно-профилактического факультета, г. Екатеринбург.

### Резюме

*Цель нашей работы:* дать объективную характеристику состояния бронхолегочной системы при муковисцидозе и обосновать применение нового класса муколитических средств, в частности Пульмозима. В работе представлены результаты исследования муколитической активности пульмозима у 60 больных муковисцидозом в возрасте от 6 до 15 лет.

*Ключевые слова:* муковисцидоз, пульмозим, рекомбинантная человеческая ДНКазы.

Муковисцидоз (МВ) — одно из наиболее частых моногеннонаследуемых заболеваний с полиорганным поражением. В России МВ является важной медико-социальной проблемой, в виду ранней инвалидизации, необходимостью систематической терапии и активного диспансерного наблюдения, а также с проблемой ранней диагностики.

Частота МВ колеблется среди представителей белой расы от 1 : 600 до 1 : 12 000 новорожденных.

В последние годы во всех развитых странах отмечается рост числа взрослых больных МВ, что связано с улучшением современных методов диагностики и терапии этого тяжелого заболевания.

Как известно в настоящее время, дефектный ген расположен в 7 хромосоме и у 70% больных ответственен за отсутствие в молекуле кодируемого белка, который называется «Трансмембранный регулятор муковисцидоза» — МВТР (CFTR — cystic fibrosis transmembrane conductance regulator). На сегодняшний день выявлены 1200 мутаций гена, ответственных за развитие симптомов МВ, большинство из которых являются редкими. В нашей стране наиболее частой является мутация F-508 (52%).

Дефект, приводящий к развитию муковисцидоза, связан с блокадой каналов для хлора (Cl) в составе клеточной мембраны эпителиальных клеток. В итоге происходит дегидратация слизистого секрета, приобретающего более густые и вязкие свойства, что приводит к обструкции выводных протоков экзокринных желез. Наиболее часто встречается и более тяжело протекает муковисцидоз с сочетанным поражением дыхательной системы и кишечника.

Дыхательная недостаточность обычна для всех больных. В основе ее, как уже говорилось, образование аномально густого секрета железами дыхательных путей, что приводит к нарушению процесса самоочищения легких, их обструкции, присоединению вторичной инфекции, кашлю, диспноэ, образованию бронхоэктазов и легочному фиброзу. Все перечисленные симптомы значительно снижают показатели качества жизни больных муковисцидозом.

С улучшением прижизненной диагностики и внедрением в терапевтическую практику новых поколений ряда препаратов (муколитиков, антибиотиков, энзимов, гепатопротекторов и др.) и рациональных, научно обоснованных методов физиотерапевтического воздействия начали меняться исходы муковисцидоза. Важно подчеркнуть, что наличие ряда клинических особенностей муковисцидоза и его исходов обусловлено как генетическими особенностями, так и адекватностью проводившейся терапии, качеством диспансерного наблюдения.

В течение последних 30 лет в результате улучшения диагностики, понимания и лечения муковисцидоза отмечается значительный рост продолжительности жизни больных при этом наследственном заболевании. В 1990 г. выживаемость больных муковисцидозом в России составляла 12 лет. В 2006 г. медиана выживаемости больных муковисцидозом в различных регионах России колебалась от 26,9 в Москве до 5,8 в Барнауле. В Екатеринбурге она составляла 20,3 года. Эти достижения привели к тому, что в настоящее время дети с муковисцидозом имеют хороший шанс достичь репродуктивного возраста. Более того, ученые, занимающиеся муковисцидозом в США, предполагают, что к 2010 г. он станет и гериатрической проблемой.

Л. М. Сергеева — к. м. н., ассистент кафедры детских болезней лечебного факультета ГОУ ВПО УГМА Росздрава.

Затраты финансовых средств и ресурсов при лечении больных муковисцидозом весьма существенны. Фактическая стоимость лечения таких больных точно не известна, однако согласно проведенным подсчетам, она варьирует от 24500\$ в год на каждого больного в Москве, в Московской области — 10000\$, в среднем по России — 3,5\$.

Цель настоящего исследования — дать объективную характеристику состояния бронхо-легочной системы при муковисцидозе и, базируясь на полученных данных комплексного обследования, обосновать применение нового класса муколитических средств, в частности человеческой рекомбинантной ДНКазы (*Пульмозим, Дорназа альфа «Ф. Хоффманн-Ля Рош Лтд», Швейцария*)

### Материалы и методы

Под наблюдением находились 60 больных муковисцидозом в возрасте от 6 до 15 лет. Диагноз муковисцидоза устанавливался согласно клинических критериев di Sant Agnese:

1. Семейный анамнез.
2. Хроническое поражение респираторной системы.
3. Признаки панкреатической недостаточности.
4. Повышение электролитов в потовой жидкости.

По общепринятым формам муковисцидоза больные распределялись следующим образом: со смешанной формой — 49, с легочной — 11.

Исследование потовой жидкости проводилось по стандартному методу Gibson & Cooke.

Анализ мутации F508 с помощью полимеразной цепной реакции ДНК проводился в лаборатории пренатальной диагностики наследственных болезней НИИ акушерства и гинекологии РАМН г. С.-Петербург (В. С. Баранов с соавт. 1991).

Оценка состояния больных подкреплялась в том числе исследованием иммунологических параметров в городском центре диагностики болезней матери и ребенка посредством определения концентрации иммуноглобулинов (Ig A, M, G d в сыворотке и мокроте (в том числе SIgA), T- и B-лимфоцитов и их субпопуляций.

Всем больным в обязательном порядке проводилась рентгенография грудной клетки, а при необходимости рентгенография придаточных пазух носа.

Эффективность препарата «Пульмозим» оценивалась по протоколу II фазы, т.е. в виде короткого курса ингаляций. Ингаляции альфа дорназы назначались по 2,5 мг в 2,5 мл в день на ингаляцию, ни с чем не смешивая, посредством небулайзерной системы Hodson T Up-draft.

Из наблюдаемых нами детей Пульмозим получали 36 больных. Контрольные группы со-

ставили 12 пациентов, получавших ацетилцистеин (ACC 100, 200 или 600 фирмы Hexal Pharma), и 6 больных использующих плацебо.

В ходе выполнения работы использовалась следующая методическая оснащенность:

— Для раннего установления обострения бронхопульмональной инфекции нами использовалась методика подсчета частоты дыхательных движений во время сна — Sleeping Respiratory Rate (SRR). У каждого пациента устанавливалась присущая ему среднеарифметическая частота дыхания, отклонение от которой более чем на 3σ расценивалось как маркер наступающего обострения бронхопульмональной инфекции.

— Исследование рецепторного аппарата (на модели тромбоцита) проводилось в ретенционном тесте по Magh в модификации Г. А. — Вершининой (1986).

— Исследование мукоцилиарного клиренса.

Для изучения вязкости использовался коагулограф Н-334, в кювету которого помещали образцы мокроты, полученной методом стимуляции кашля у больных муковисцидозом и рецидивирующими хроническими заболеваниями легких в периоде обострения процесса. Результат оценивался измерением размаха амплитуды кривой коагулографа в мм.

Для изучения влияния муколитических средств на мокроту in vitro удобным оказался метод поляризационной микроскопии, позволяющей оценить жидкокристаллическую структуру слизи респираторного тракта.

Изучение функционирования цилиарного эпителия проводилось с помощью сахаринового теста, заключающегося в нанесении кусочков сахара на слизистую полости носа больным без признаков ОРВИ и кашля с последующим появлением ощущения сладкого вкуса в полости рта. Оценка теста проводилась в минутах.

— Методы исследования функционального состояния кардиореспираторной системы включали в себя определение кардиоинтервала (КИГ); пульсоксиметрии с помощью аппарата Omeda Biox 3700e с пальцевым датчиком (длина волны 940 nm).

— Функция внешнего дыхания изучалась с помощью аппарата Pneumoscor (фирма Jeger) и регистрацией пика скорости выдоха с помощью устройства Peak Flow Meter (PFM), которая является весьма простым методом. Показатель PFM представляет собой многофакторный параметр, в основном отражая сужение проходимости дыхательных путей, состояние легочных объемов, статическую растяжимость и силу мышц на выдохе, который коррелирует с ФЖЕЛ, ОФV<sub>1</sub> и некоторыми нереспираторными показателями (Smith et al., 1987; Morris et al., 1990).

— Оценка реакции макроорганизма на применение Пульмозима проводилась с помощью определения прироста титра антител к ДНК, а также реакции торможения миграции, основанной на способности сенсбилизированных лимфоцитов выделять лимфокины в присутствии специфического антигена (Пульмозим в различных разведениях: от цельного до 1:1000). Результат РТМЛ учитывался путем измерения зон миграции клеток в агаровом геле (В. Н. Денисов, 1981).

— Обработка результатов исследования проводилась методом вариационной статистики (Л. С. Каминский, 1964) с вычислением средних величин ( $\bar{X}$ ), квадратичного отклонения ( $\sigma$ ), ошибки средней ( $m$ ). Также проводился корреляционный анализ: коэффициент корреляции ( $r$ ) и критерий  $\chi^2$ . Учет совокупности количественных изменений осуществлялся с использованием энтропии — количественной меры неопределенности (хаотичности) распределения.

## Результаты и обсуждение

Как показал анализ 28 анкет, у всех детей, перенесших обострение бронхолегочного процесса, за 4 дня до этого произошло значительное (на 3σ) учащение частоты дыхания после засыпания.

Интересно отметить, что у 4 больных, у которых развились признаки ОРВИ (повышение температуры тела, симптомы интоксикации и др.), SRR тест накануне был отрицательным.

Следовательно, SRR оказался весьма надежным способом предсказания обострения респираторного синдрома у больных муковисцидозом.

Исследование функции внешнего дыхания проводилось нами у 22 больных муковисцидозом от 6 до 15 лет в периоде относительной ремиссии, когда клиничко-лабораторные данные свидетельствовали об отсутствии выраженных признаков обострения бронхолегочного процесса. Контрольную группу составили 18 больных рецидивирующим бронхитом аналогичного возраста.

На первом этапе изучения эффективности Пульмозима мы провели исследование влияния альфа дорназы на образцы мокроты больных *in vitro*, на втором — изучались показатели мукоцилиарного клиренса и кардиореспираторной функции у больных в процессе лечения.

Исследование реологических характеристик мокроты *in vitro* выполнено в динамике до и после ее контакта с препаратом.

Исходный уровень вязкости мокроты по показателям коагулографа в среднем составил  $27,9 \pm 3,3$  мм. В контрольном исследовании — добавление дистиллированной воды (в дальнейшем placebo) — вязкость изменилось незначи-

тельно —  $28,5 \pm 3,2$  мм. Добавление к образцам мокроты муколитических препаратов приводило к существенному статистически значимому снижению ее вязкоэластических свойств: после контакта с ацетилцистеином —  $57,0 \pm 2,8$  мм и после добавления Пульмозима —  $63,0 \pm 3,4$  мм.

Кроме того, нами изучалось влияние Пульмозима на мокроту больных *in vitro* посредством поляризационной микроскопии: во всех исследуемых образцах отмечалось изменение волокнистых структур. По состоянию жидкокристаллической структуры мокроты средний уровень у больных муковисцидозом до лечения составил  $+3,9 \pm 0,5$ , после добавления дистиллированной воды —  $+3,1 \pm 0,09$ , ацетилцистеина —  $+1,9 \pm 0,1$  ( $p < 0,001$ ), альфа дорназы —  $+2,1 \pm 0,09$  ( $p < 0,001$ ).

Таким образом, нами были получены позитивные результаты *in vitro*, дающие основание для клинического применения Пульмозима.

Как указывалось выше, показатель сахаринового теста у здоровых детей в среднем составил  $7,39 \pm 0,89$  мин, а у больных муковисцидозом —  $23,1 \pm 1,32$  мин ( $p < 0,001$ ). Применение placebo существенного влияния на время сахаринового теста не оказало —  $21,2 \pm 1,2$  мин. Лечение ацетилцистеином привело к несущественному улучшению сахаринового теста —  $20,8 \pm 1,8$  мин. После II фазы испытания Пульмозима у больных муковисцидозом произошло улучшение функции МЦК, что выразилось в уменьшении времени сахаринового теста до  $19,2 \pm 0,9$  мин ( $p < 0,05$ ).

Проведенное нами изучение ФВД в динамике лечения Пульмозимом показало, что муколитическое воздействие rhDNase на мокроту больных муковисцидозом привело к значительному улучшению параметров динамики дыхания. Так, произошел прирост показателя РФМ с  $283 \pm 56$  л/мин до  $397 \pm 46$  л/мин ( $p < 0,05$ ). Практически до такого же уровня увеличился пик форсированного выдоха при лечении ацетилцистеином —  $382 \pm 38$  л/мин. В отличие от этого, применение placebo ни коим образом не сказалось на данном показателе механики дыхания —  $278 \pm 47$  л/мин.

Параметры спирографии аналогичным образом отразили положительную динамику лечения Пульмозимом на ФВД у больных муковисцидозом: уровень ФЖЕЛ возрос с 66,1 до 78,8%, т.е. в среднем на  $12,7 \pm 2,6\%$  ( $p < 0,05$ ), а ОФВ<sub>1</sub> с 62 до 71,4%, в среднем на  $9,4 \pm 3,5\%$  ( $p < 0,05$ ).

При лечении ацетилцистеином прирост ФЖЕЛ составил в среднем  $8,4 \pm 1,2\%$ , а ОФВ<sub>1</sub> —  $6,1 \pm 0,9\%$ .

Одновременно нами оценивалось влияние placebo на вышеуказанные показатели внешнего дыхания у 12 больных муковисцидозом.

Таблица Средние показатели РТМЛ с Пульмозимом в динамике лечения ( $X \pm m$ , в мм)

| Параметры         | До лечения | После лечения |
|-------------------|------------|---------------|
| Контроль          | 19,03±2,58 | 18,41±2,39    |
| Без разведения    | 17,87±2,66 | 14,46±1,47    |
| Разведение 1:10   | 18,67±2,51 | 14,68±1,3     |
| Разведение 1:100  | 16Д9±2,39  | 15,3±1,42     |
| Разведение 1:1000 | 16,45±3,38 | 16,76±2,92    |

Анализ сравнительного изучения показал, что при использовании плацебо ФЖЕЛ уменьшилась в среднем на  $0,4 \pm 0,1\%$ , а ОФВ<sub>1</sub>, — на  $1,8 \pm 0,7\%$  ( $p < 0,05$ ).

Следовательно, применение rhDNase по протоколу II фазы оказывает существенное положительное воздействие на механику дыхания больных, что выражается в приросте параметров ФВД, как PFM, ФЖЕЛ и ОФВ<sub>1</sub>.

Параллельно с клиническим испытанием Пульмозима у больных муковисцидозом, мы провели проверку гипотезы о том, что рекомбинантная человеческая ДНКазы стимулирует иммунный ответ макроорганизма, а уменьшение концентрации внеклеточной ДНК в мокроте больных влияет на уровень антител к ДНК в крови. Это представилось нам особенно важным, поскольку ген rhDNase был клонирован из библиотеки панкреатической кДНК, сам фермент синтезируется клетками яичника китайского хомячка с внедренной в них последовательностью человеческого гена rhDNase I (*Shak et al., 1990*).

Ни у одного из больных испытываемой группы анафилактических реакций, клинически значимого бронхоспазма нами отмечено не было. Нежелательную реакцию в виде появления осиплости голоса дали лишь двое больных, причем данное побочное действие полностью исчезло сразу после окончания курса лечения.

Средний уровень логарифма титра сывороточных антител к ДНК до лечения составил  $\log 1,31 \pm 0,054$ , а после лечения —  $\log 1,35 \pm 0,06$  (разница статистически недостоверна). Нам удалось отметить, что у 5 больных произошло понижение титра антител. Следовательно, использование Пульмозима в лечении больных муковисцидозом не влияет на иммунокомпетентные органы организма, что выразилось в отсутствии нарастания титра антител к ДНК.

Исследование иммуногенности Пульмозима в реакции торможения миграции лимфоцитов не показало наличие положительной реакции ни у одного больного. В среднем у больных до лечения в контроле РТМЛ равнялась  $19,03 \pm 2,58$  мм, при добавлении Пульмозима реакция несколько замедлилась: на цельную rhDNase —  $17,87 \pm 2,66$  мм, на разведение

1:10 —  $18,67 \pm 2,51$  мм, на разведение 1:100 —  $16,49 \pm 2,39$  мм и на разведение 1:1000 —  $16,45 \pm 3,38$  мм (разница статистически недостоверна).

Аналогичным образом вели себя средние показатели РТМЛ и после курса лечения (таблица) Как видно из таблицы после курса лечения Пульмозимом наметилась лишь тенденция к торможению миграции лимфоцитов, однако разница оказалась статистически недостоверной.

Таким образом, применение rhDNase коротким курсом не увеличивает риск иммунных реакций вследствие лечения данным препаратом, а использование Пульмозима по протоколу II фазы не оказывает существенного влияния на профиль безопасности rhDNase.

## Выводы

1. Метод определения частоты дыхания во время сна оказался весьма надежным способом предсказания обострения респираторного синдрома, который у больных муковисцидозом проявляется в виде вторичной хронической пневмонии или бронхита. Данное обстоятельство открывает перспективу его применения при других хронических заболеваниях органов дыхания у детей, сопровождающихся бронхопальмональной инфекцией и требующих своевременной антибактериальной терапии.

2. Изучение влияния Пульмозима у больных муковисцидозом показало его высокую эффективность при коротком курсе лечения, что выразилось в улучшении характеристик мукоцилиарного клиренса, функции внешнего дыхания и кардиореспираторной функции.

3. Лечение больных Пульмозимом по протоколу II фазы не приводит к клиническим проявлениям осложнений, не увеличивает риск иммунных реакций и не оказывает существенного влияния на профиль безопасности человеческой рекомбинантной ДНКазы.

## Литература

1. Воронова И. М., Гавалов С. М., Зайнуллин И. Г. и др. Динамика реологии бронхиального секрета при лечении ацетилцистеином (АЦЦ) детей с хроническими бронхолегочными заболеваниями. 6 Национальный конгресс по болезням органов дыхания. Новосибирск, 1996.
2. Зайцева О. В., Левин А. Б., Выхристюк О. Ф. и др. Применение ацетилцистеина (АЦЦ) в комплексном лечении детей с бронхолегочными заболеваниями. 6 Национальный конгресс по болезням органов дыхания. Новосибирск, 1996; 328.
3. Капранов Н. И. генетика, диагностика, особенности клинического течения и терапии у детей. Материалы научно-практической конференции, посвященной 10-летию Республиканской клинической больницы. Москва, 1995; 96-97.

Полный список литературы см. на сайте [www.urmj.ru](http://www.urmj.ru)