

11. Pick A., Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages. *Cell. Immunol.* 1981; 59: 301—8.
12. Kratnov A.E., Potapov P.P., Vlasova A.V., Uglov E.S., Sukhorukov V.S. The activity of glutathionereductase in neutrophils of patients with mucoviscidosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2005; 2: 33—7. (in Russian)
13. Mamontova N.S., Beloborodova E.I., Tukulova L.I. Activity of catalase at chronic dipsomania. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 1994; 1: 27—8. (in Russian)
14. Gashkova V., Matl I., Kashlik I. Circulating complexes in patients with immune complex diseases and after transplantation of kidneys. *Chekhoslovatskaya meditsina.* 1978; 2: 117—22.
15. Malnick S.D., Knobler H. The medical consequences of obesity. *Quart. J. Med.* 2006; 99: 565—79.
16. Kenchaiah S., Evans J.C., Levy D., Wilson P.W., Benjamin E.J., Larson M.G. et al. Obesity and the risk of heart failure. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347: 305—13.
17. Chumakova G.A., Veselovskaya N.G., Kozarenko A.A., Vorob'eva Yu.V. Features of morphology, structure and function of the heart at obesity. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal.* 2012; 4: 93—9. (in Russian)
18. Das U.N. Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition.* 2001; 17: 953—66.
19. Cave M.C., Hurt R.T., Frazier T.H., Matheson P.J., Garrison R.N., McClain C.J. et al. Obesity, Inflammation, and the Potential Application of Pharmaconutrition. *Nutr. Clin. Pract.* 2008; 23(1): 16—34.
20. Storozhakov G.I. Dilated cardiomyopathy — connection with an inflammation. *Serdechnaya nedostatochnost'.* 2008; 2: 91—6. (in Russian)
21. Serov V.V., Paukov V.S. Inflammation. Moscow: Meditsina; 1995. (in Russian)
22. Matthews S.B., Henderson A.H., Campbell A.K. The adrenochrome pathway: the major for adrenalin catabolism by polymorphonuclear leucocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1985; 17: 339—48.
23. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Belenkov Yu.N. Free radical process in diseases of the cardiovascular system. *Kardiologiya.* 2000; 7: 48—57. (in Russian)

Поступила 25.04.14  
Received 25.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014  
УДК 616.248-092:612.127]-08-07

## ОКСИДАТИВНЫЙ СТРЕСС В ПАТОГЕНЕЗЕ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ: МЕТОД КОРРЕКЦИИ С ПОМОЩЬЮ ИНГАЛЯЦИИ ФОСФОЛИПИДНЫХ НАНОЧАСТИЦ

Лисица А.В.<sup>1</sup>, Соодаева С.К.<sup>2</sup>, Климанов И.А.<sup>2</sup>, Аверьянов А.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, 115682 Москва; <sup>2</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии» ФМБА России, 105077 Москва

*Представлены результаты проспективного простого слепого рандомизированного плацебо-контролируемого исследования по оценке динамики биомаркеров оксидативного стресса (суммарная концентрация нитрат- и нитрит-анионов в конденсате выдыхаемого воздуха и плазме крови, рН конденсата выдыхаемого воздуха, общая антиоксидантная активность плазмы крови) на фоне ингаляционного введения фосфолипидных наночастиц у пациентов с бронхиальной астмой. Полученные данные свидетельствуют о статистически значимом положительном влиянии предложенного метода терапии на динамику основных показателей оксидативного стресса у больных, о снижении концентрации метаболитов оксида азота и повышении общей антиоксидантной активности плазмы крови. Клинически значимых нежелательных явлений в ходе исследования не зарегистрировано.*

**Ключевые слова:** бронхиальная астма; фосфолипиды; оксидативный стресс; репарация мембран; суммарная концентрация нитрат- и нитрит-анионов в конденсате выдыхаемого воздуха и плазме крови; рН конденсата выдыхаемого воздуха; общая антиоксидантная активность плазмы крови; рандомизированное контролируемое исследование.

### OXIDATIVE STRESS IN PATHOGENESIS OF BRONCHIAL ASTHMA: A METHOD OF CORRECTION BY INHALATION OF PHOSPHOLIPID NANOPARTICLES

Lisitsa A.V.<sup>1</sup>, Soodaeva S.K.<sup>2</sup>, Klimanov I.A.<sup>2</sup>, Aver'yanov A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Research and Practical Centre of Specialized Medical Aids and Medical Technologies, Moscow; <sup>2</sup>Research Institute of Pulmonology, Moscow, Russia

*The authors present the results of a prospective simple blind randomized placebo-controlled study for the evaluation of dynamics of biomarkers of oxidative stress (total concentration of nitrate- and nitrite-anions in condensed exhaled breath and plasma, pH of exhaled breath, total antioxidative activity of plasma in patients with bronchial asthma inhaling phospholipid nanoparticles. The results suggest significant positive effect of proposed therapy on dynamics of the main parameters of oxidative stress including reduced concentration of nitric oxide metabolites and increased total antioxidative activity of plasma. No clinically significant reactions were documented.*

**Key words:** bronchial asthma; phospholipids; oxidative stress; membrane reparation; total concentration of nitrate- and nitrite-anions in condensed exhaled breath and plasma; pH of exhaled breath; total antioxidative activity of plasma; randomized placebo-controlled study.

В настоящее время воздействие активных форм кислорода (АФК) и активных форм азота (АФА) считают универсальным механизмом повреждения как белковых, так и липидных структурных компонентов клетки [1]. АФК и АФА образуются в ходе окисления различных биологических молекул (в первую очередь

фосфолипидов), повреждения внеклеточного матрикса, инактивации защитных свойств основных антиоксидантных систем [2].

Естественными основными антиоксидантами, в норме присутствующими в любой клетке любой ткани организма, являются [3]:

- ферментные антиоксиданты — супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза, глутатионредуктаза и восстановленный глутатион;
- макромолекулярные неферментативные компоненты: трансферрин, церулоплазмин и другие белки, способные связывать ионы железа;
- низкомолекулярные компоненты: стероидные гормоны, витамины А, Е, К, С, убихинон, биофлавоноиды.

При развитии патологического воспалительного процесса естественная антиоксидантная система часто оказывается перегруженной и буквально захлебывается лавиной свободных радикалов. Такое состояние называется оксидативным стрессом. Оксидативный стресс представляет собой важнейшее звено в молекулярном механизме развития многих хронических воспалительных заболеваний, в том числе и бронхиальной астмы (БА) [4].

Наиболее значимыми АФК являются пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), супероксид-анион ( $O_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $OH$ ) и некоторые другие [5], приводящие к наиболее существенным повреждениям биомолекул.

Повреждения структуры биомембран и сопряженных с ними функций большинства трансмембранных и околомембранных белков (ферментов, рецепторов, транспортных белков и др.) нарушают нормальное течение многих внутри- и внеклеточных обменных процессов и функционирование клетки в целом [6]. Механизмы повреждения мембранных ферментов включают повреждение как самой белковой молекулы, так и ее микроокружения. Вызванное окислительным повреждением ингибирование активности мембранных ферментов усугубляется изменениями физико-химических свойств липидного бислоя.

Доказано, что введение липосом из фосфатидилхолина способствует стабилизации липидного матрикса мембран, замедлению инактивации цитохрома Р450, нормализации его активности, восстановлению активности глюкозо-6-фосфатазы и снижению скорости развития некротических процессов [7, 8].

Что касается изучения системы цитохрома Р450 в легких, то в настоящее время все большее внимание специалистов, занимающихся проблемами диагностики и мониторинга легочных заболеваний, привлекает изучение конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) [9, 10].

В составе КВВ на сегодняшний день достоверно идентифицировано более 100 соединений, в той или иной степени являющихся маркерами патологических процессов, происходящих в разных отделах бронхолегочной системы. С появлением новых методик и повышением их чувствительности число этих маркеров стремительно увеличивается. Исследование КВВ подразумевает использование неинвазивной методики сбора КВВ, необременительной как для пациента, так и для медицинского персонала [11].

В КВВ возможно оценить содержание оксида азота (NO), определив его более стабильные метаболиты, такие как нитрат- и нитрит-анионы, 3-нитротирозин, нитрозотиолы. Нитрат- и нитрит-анионы являются

наиболее стабильными из указанных метаболитов. Метаболизм NO и кислородных радикалов имеют общие точки соприкосновения, влияя на концентрации определяемых молекул друг друга [12].

## Материал и методы

Для сбора КВВ наиболее широко используются коммерческие устройства — конденсор ECoScreen (Erich Jaeger, Германия) и трубка R-tubes (Respiratory Research Inc., Charlottesville, США), в то время как некоторые лаборатории используют свои оригинальные аппараты.

Использование коммерческих моделей оказывается оптимальным, так как позволяет избежать возможных проблем при использовании различных устройств. Эти модели имеют однонаправленный клапан, который предотвращает случайное попадание охлажденного воздуха из охлаждающей камеры при вдохе (рис. 1). Аппарат должен быть снабжен уловителем слюны с ротовым загубником, который имеет входную (ингаляционную) и выходную части.

Использование фильтра не рекомендуется, так как он может стать ловушкой молекул в выдыхаемом воздухе [13]. Наличие одностороннего клапана и сбор с использованием одноразовых устройств ограничивают риск инфекции (см. рис. 1).

В настоящем исследовании был использован аппарат для сбора КВВ R-tubes (Respiratory Research Inc., Charlottesville, США).

Сбор КВВ является безопасным методом получения информации о состоянии респираторного тракта. В 10 тыс. измерений, выполненных в разных лабораториях с применением разных устройств и способов, никаких нежелательных явлений не зафиксировано. До сих пор не отмечено побочных эффектов у пациентов с тяжелым течением или обострением хронической обструктивной болезни легких [14, 15].

КВВ имеет преимущества перед получением бронхоальвеолярного лаважа, так как является неинвазивным методом; нет необходимости вводить медикаменты в дыхательные пути перед проведением процедуры. Жидкость, покрывающая альвеолярный эпителиальный слой, находится в образцах КВВ в большом разведении. В образцах могут определяться не только альвеолярные компоненты этой жидкости, но и составляющие слизистой оболочки дыхательных путей [13].



Рис. 1. Схема сбора КВВ.

Сбор КВВ производят с использованием носового зажима, который позволяет предотвратить любой случайный дыхательный маневр вдоха или выдоха через нос, что является более надежным способом предотвращения попадания медиаторов из полости носа. Использование носового зажима сводит к минимуму попадание частиц из носоглотки и предотвращает потерю образца через полость носа [13].

Самый распространенный интервал времени при сборе КВВ составляет 10—30 мин, но в большинстве случаев используется 10-минутный промежуток. В среднем за 10 мин спокойного дыхания у взрослого человека можно получить 1—3 мл КВВ (средний объем КВВ составляет 100 мкл/мин, диапазон — от 40 до 300 мкл/мин).

*Исследование общей концентрации нитратов/нитритов в конденсате выдыхаемого воздуха.* Нитраты восстанавливали до нитритов оригинальным кадмиевым восстановителем с использованием реактива Грисса [16], и дальнейшее количественное определение проводили с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF).

Метод применяют для определения нитрит-ионов в концентрации от 0,005 до 0,5 мг/л. Присутствующие в пробе нитриты проходят через редуктор без изменения. Содержание нитратов в пробе определяют по калибровочному графику, построенному в диапазоне от 1 до 50 мкмоль на 1 л нитритов.

*Исследование общей концентрации нитратов/нитритов в крови.* Осаждение белков проводили с использованием 50% трихлоруксусной кислоты. К 900 мкг сыворотки добавляли 100 мкг 50% трихлоруксусной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Супернатант отбирали и довели рН до 9,0 1 М раствором NaOH [17]. Нитраты восстанавливали до нитритов оригинальным кадмиевым восстановителем, и дальнейшее определение проводили так же, как описано выше для определения суммарной концентрации нитратов и нитритов в КВВ.

*Исследование антиоксидантной активности плазмы крови.* Для определения антиоксидантной активности (АОА) плазмы крови применяли метод, разработанный в лаборатории молекулярной и клеточной радиобиологии НИИ медицинской радиологии РАМН (Обнинск). Метод основан на спектрофотометрическом определении малонового диальдегида, образующегося в модельной системе в результате реакции перекисного окисления липосом лецитина, индуцированной ионами двухвалентного железа в присутствии анализируемого образца плазмы крови [18]. АОА плазмы крови, определяемая в модельной системе «лецитин—ионы  $Fe^{2+}$ » по выходу продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, отражает общее состояние антиоксидантной системы (АОС) организма. Преимущества этого методического подхода заключаются в способности интегрально оценить такие компоненты АОС, как связывание и окисление ионов железа, перехват свободных радикалов, восстановление и разрушение гидро- и

липоперекисей, образующихся в ходе реакции. Показатели АОА представлены как средние значения и стандартные ошибки (в относительных единицах).

Исследование рН КВВ проводили с использованием прибора рН-302 (Hanna, Германия) непосредственно после сбора КВВ у пациента, а также после размораживания образца с целью контроля.

*Оценка безопасности.* С целью оценки безопасности применения и переносимости исследуемого препарата проводили учет нежелательных явлений в индивидуальных регистрационных картах и дневниках самоконтроля, клинической оценки состояния больного, данных ЭКГ и определения биохимического анализа крови до начала лечения и в конце лечения.

*Дизайн исследования.* Положительное влияние ингаляционного введения фосфолипидов на клинико-функциональный статус пациентов с БА уже было показано ранее [19, 20], однако основные биомаркеры оксидативного стресса в предыдущих исследованиях не определяли.

С целью подтвердить либо опровергнуть возможность коррекции негативных последствий оксидативного стресса, играющего немаловажную роль в патогенезе БА, с помощью добавления ингаляций нанолипосом к комплексной терапии у пациентов с БА было проведено клиническое исследование, в которое включено 58 пациентов обоего пола: 37 (63,8%) мужчин и 21 (36,2%) женщина (средний возраст  $67,5 \pm 12,3$  года).

По дизайну это было проспективное простое слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах. Пациенты, соответствующие всем критериям включения/исключения, были рандомизированы в соотношении 1:1 в 2 группы. Рандомизация осуществлялась с помощью случайной выборки. Всем пациентам присвоены порядковые номера от 1 до 60. Листки с кодом лечения (1-я или 2-я группа соответственно) в произвольном порядке были помещены в непрозрачные запечатанные конверты, конверты случайным образом перемешаны, и на них проставлен порядковый номер пациента — от 1 до 60. По мере проведения скрининга вскрывали конверт, соответствующий номеру пациента в порядке возрастания, и назначали соответствующее лечение.

В 1-ю (основную) группу включили 30 пациентов, получавших ингаляции фосфолипидного препарата через компрессорный небулайзер 1 раз в сутки в дозе 1250 мг (300 мг фосфолипида) на фоне стандартной базисной терапии БА в соответствии с глобальной стратегией лечения и профилактики БА GINA-2007 [21], во 2-ю (контрольную) группу — 28 пациентов, у которых лечение БА проводили только по традиционной схеме в соответствии с рекомендациями GINA-2007. В качестве плацебо использовали 5% раствор мальтозы, в качестве фосфолипидного нанолипосомального препарата — фосфатидилхолин/глицерризиновую кислоту производства НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича. Длительность терапии составила 24 нед, количество визитов в клинику — 8. Общая про-

должительность клинического исследования составила 3 года (2008—2011 гг.), экспериментальная часть и анализ результатов длились с 2011 по 2013 г.

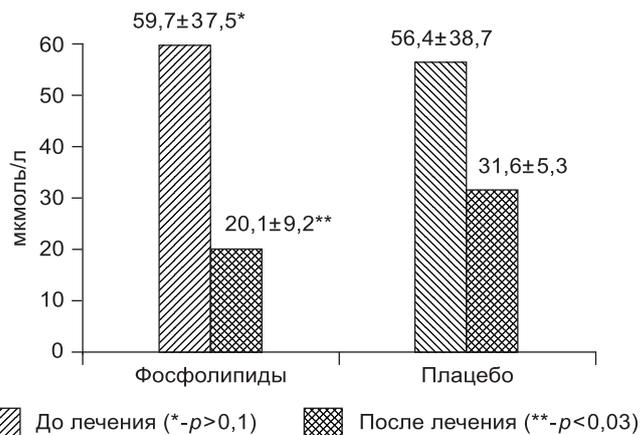
Основные критерии включения/исключения приведены в табл. 1.

Статистическую обработку результатов исследования проводили путем оценки значимости различий результатов исходного и последующего измерения при помощи парного критерия *t* Стьюдента для связанных выборок (для показателей с нормальным распределением) или при помощи непараметрического критерия Уилкоксона для связанных выборок с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0 (Statsoft Inc., США). Анализ связи признаков проводили с помощью метода регрессионного анализа и с использованием коэффициента корреляции Пирсона (*r*). Доверительная вероятность предполагалась равной 95% ( $p = 0,05$ ), т. е. различия показателей при  $p < 0,05$  рассматривали как статистически значимые. Все регистрируемые характеристики представлены в виде  $MEAN \pm SD$ .

## Результаты и обсуждение

Выдыхаемый NO является весьма лабильным показателем степени воспаления в респираторном тракте [22]. Несмотря на кажущуюся простоту измерения этого параметра, возможны ошибки в определении, а имеющийся значительный разброс данных указывает на вариабельность концентрации FeNO (FeNO — выдыхаемая фракция NO) у конкретных пациентов [23].

В связи с этим в настоящем исследовании проведено изучение стабильных метаболитов NO в КВВ для оценки эффективности проводимой терапии у пациентов, получающих базисную терапию БА. Оценивали суммарную концентрацию нитратов и нитритов в КВВ ( $\Sigma NO_3^-/NO_2^-$ ), которая является интегральным показателем синтеза NO в респираторном тракте; использо-



**Рис. 2.** Показатели суммарной концентрации нитратов/нитритов в КВВ у больных, получавших ингаляции фосфолипидов и плацебо соответственно, до начала лечения и после его окончания.

вание этого показателя в качестве маркера активности воспалительного процесса при БА представлялось более предпочтительным.

При поступлении в стационар  $\Sigma NO_3^-/NO_2^-$  в КВВ была достоверно выше у пациентов обеих групп в сравнении с общепринятой нормой (до 5 мкмоль/л). В основной группе этот показатель составил  $59,7 \pm 37,5$  мкмоль/л, в контрольной —  $56,4 \pm 38,7$  мкмоль/л ( $p > 0,1$ ; рис. 2).

К концу лечебного периода наблюдалось выраженное снижение  $\Sigma NO_3^-/NO_2^-$  в группе больных, получавших ингаляции нанолипосом, в то время как при применении плацебо уровень нитратов и нитритов в КВВ снижался не столь значительно ( $20,1 \pm 9,2$  и  $31,6 \pm 5,3$ ,  $p < 0,03$ ; см. рис. 2). Полученные результаты указывают на выраженное подавление процессов оксидативного стресса в бронхиальном дереве при применении липосомальной терапии по сравнению с таковым при приеме плацебо.

**Таблица 1.** Критерии включения в исследование/исключения из исследования

Критерии включения	Критерии исключения
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Взрослые дееспособные мужчины и женщины старше 18 лет</li> <li>2. Наличие письменного информированного согласия, полученного от пациента до проведения любых процедур, связанных с исследованием</li> <li>3. Диагноз частично контролируемой либо неконтролируемой БА, установленный в соответствии с руководством GINA версии 2007 г., за 6 мес до включения в исследование</li> <li>4. Пациенты с объемом форсированного выдоха за 1 с (ОФВ<sub>1</sub>) от 50 до 80% от должного</li> <li>5. Документально подтвержденный положительный тест на обратимость (в течение последних 6 мес до включения в исследование), определяемый как <math>\Delta O\Phi B_1 \geq 12\%</math> (<math>\geq 200</math> мл) относительно исходного уровня</li> <li>6. Пациенты с БА, которые уже получали как средство базисной терапии фиксированную комбинацию ингаляционных кортикостероидов/БАДД (в виде одного комбинированного или нескольких разных ингаляторов), эквивалентную по дозировке сальметеролу/флутиказону 100/500 мкг/сут, в неизменной дозе за 3 мес до включения в исследование</li> <li>7. Некурящие или бывшие курильщики с индексом курильщика <math>&lt; 5</math> пачко-лет и бросившие курить в течение как минимум 1 года до включения в исследование</li> <li>8. Желание сотрудничать и достаточный комплаенс при выполнении процедур исследования</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Беременные или кормящие женщины</li> <li>2. Наличие в анамнезе госпитализации из-за обострения БА в отделение интенсивной терапии, проведение искусственной вентиляции легких, жизнеугрожающие состояния</li> <li>3. Диагноз ХОБЛ, установленный согласно текущей версии руководства GOLD</li> <li>4. Госпитализация из-за обострения БА в течение 1 мес перед скрининговым визитом</li> <li>5. Инфекция нижних дыхательных путей в течение 1 мес перед скрининговым визитом</li> <li>6. Наличие в анамнезе муковисцидоза, бронхоэктазов, дефицита <math>\alpha_1</math>-антитрипсина и рестриктивного легочного процесса</li> <li>7. Пациенты, получавшие перорально или парентерально кортикостероиды в предыдущие 3 мес перед скрининговым визитом</li> <li>8. Установленная или доказанная гиперчувствительность к исследуемому препарату (фосфатидилхолин/глицерризиновая кислота) или его компонентам</li> <li>9. Участие в других клинических исследованиях в течение 1 мес перед скрининговым визитом</li> <li>10. Наличие значимого медицинского анамнеза и/или лечения кардиологических, почечных, неврологических, печеночных, эндокринных, онкологических заболеваний или наличие любых отклонений лабораторных показателей от нормы, что может служить показателем клинически значимого заболевания, согласно мнению исследователя</li> </ol>

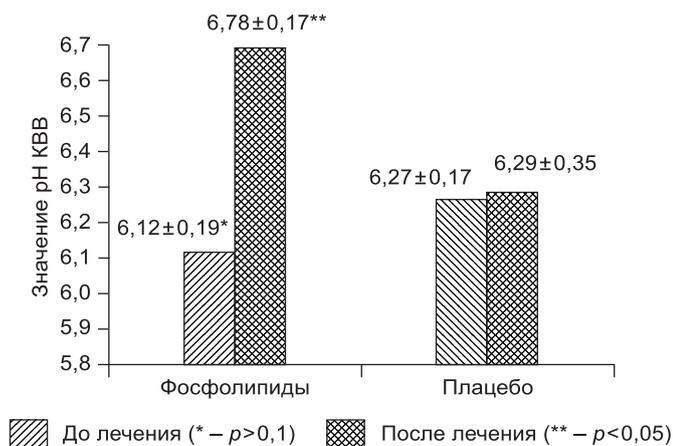


Рис. 3. Значения уровня pH КВВ у больных, получавших ингаляции фосфолипидов и плацебо, до начала лечения и после его окончания.

Для оценки степени воспалительных изменений в респираторном тракте исследован такой показатель, как pH КВВ, и оценена его взаимосвязь с другими маркерами воспаления ( $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ).

pH КВВ измеряли непосредственно после сбора образца, до его замораживания; после размораживания еще раз проводили контрольное измерение pH и вычисляли средний результат. Необходимо отметить, что ни в одном образце статистически значимых различий показателей pH до и после размораживания не зафиксировано, а имеющиеся изменения находились в пределах ошибки среднего, что хорошо согласуется с результатами исследований, проведенных ранее [24].

В начале наблюдения значение pH КВВ у пациентов обеих групп было статистически значимо ниже нормальных значений этого показателя. В настоящем исследовании за норму принимали значения pH от 6,99 до 7,04. В основной группе этот показатель составил 6,12 ± 0,19, а в контрольной — 6,27 ± 0,17 ( $p > 0,1$ ; рис. 3).

После курса терапии отмечено статистически значимое повышение значения pH у больных, получавших терапию ингаляционными фосфолипидами, по сравнению с показателями в контрольной группе (6,78 ± 0,17 и 6,29 ± 0,35 соответственно,  $p < 0,05$ ). Стоит отметить, что у пациентов, получавших плацебо, значение pH статистически значимо не изменилось по сравнению с исходным, в то время как у больных, получавших ингаляции нанолипосом, повышение было существенным. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что ингаляционное введение наночастиц фосфолипидов существенно влияет на значение pH КВВ, приближая его к нормальным значениям (см. рис. 3).

В целях комплексной оценки антиоксидантного статуса организма в настоящем исследовании проведена оценка суммарной концентрации нитратов и нитритов в плазме крови и уровня АОА плазмы крови. Несмотря на то что препарат вводили ингаляционно и наибольший эффект был ожидаем в месте введения, нельзя было исключить того обстоятельства, что подавление активности АФК в респираторном тракте отразится на АОС организма в целом.

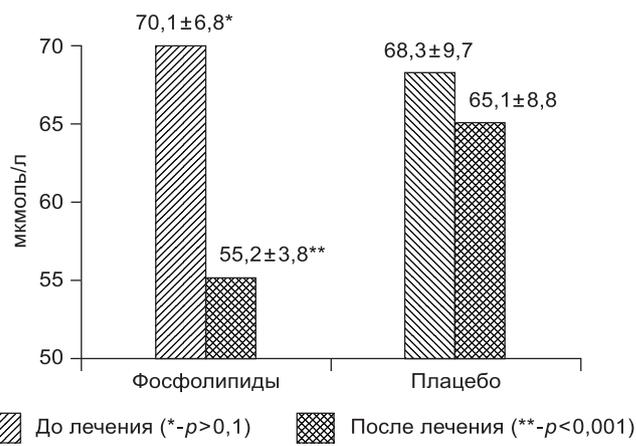


Рис. 4. Показатели суммарной концентрации нитратов/нитритов в плазме крови у больных, получавших ингаляции фосфолипидов и плацебо соответственно, до начала лечения и после его окончания.

Согласно результатам проведенных ранее исследований [25], при обострении БА наблюдаются гиперпродукция свободных радикалов в плазме крови и соответственно снижение АОА последней.

Показатель  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови был выбран как маркер атопического воспаления для последующего сравнения с  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в КВВ.

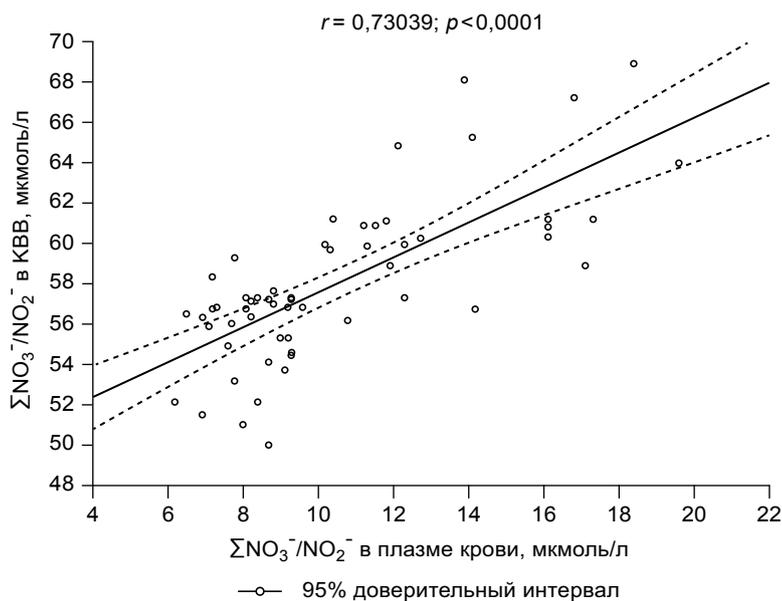
Значения  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови от 45 до 55 мкмоль/л в настоящем исследовании были приняты в качестве референсных. Исходно у пациентов обеих групп отмечены повышенные значения: 70,1 ± 6,8 мкмоль/л в основной группе и 68,3 ± 9,7 мкмоль/л в контрольной ( $p > 0,1$ ; рис. 4).

По окончании лечения зафиксировано статистически значимое снижение показателя  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови у пациентов, получавших ингаляции фосфолипидов, по сравнению с показателями в контрольной группе: 55,2 ± 3,8 и 65,1 ± 8,8 ( $p < 0,001$ ; рис. 4). Несмотря на незначительные различия изучаемых показателей в группах в абсолютных величинах (менее 10 мкмоль/л), достоверность различий довольно высока, что свидетельствует о значимом влиянии препарата на процессы воспаления и оксидативного стресса, сопровождающиеся генерацией АФА в респираторном тракте.

Снижение концентрации свободных радикалов в респираторном тракте сопровождается уменьшением их содержания также и в плазме крови, т. е. на уровне организма в целом. Полученные результаты связаны скорее всего с репаративным действием фосфолипидов на мембраны поврежденных воспалением клеток и восстановлением морфофункциональной активности последних.

Таким образом, в ходе настоящего исследования получены статистически значимые данные о снижении  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  как в КВВ, так и в плазме крови при ингаляционном введении фосфолипидов в комплексной терапии БА по сравнению с показателем при использовании плацебо. В связи с этим представлялось чрезвычайно важным оценить корреляционную связь этих показателей.

В результате выявлена сильная положительная корреляционная связь  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в КВВ и  $\Sigma\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в



**Рис. 5. Корреляционная связь суммарной концентрации нитратов/нитритов в КВВ и плазме крови после окончания лечения у больных, получавших ингаляции фосфолипидов.**

плазме крови ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,0001$ ; рис. 5). Такая связь может служить признаком того, что ингаляционное введение наноразмерных липосом не только оказывает местное противовоспалительное действие, но и влияет на процессы оксидативного стресса на уровне организма в целом.

Еще одним показателем, изученным в настоящем исследовании и характеризующим антиоксидантный статус организма, была АОА плазмы крови, которую оценивали по уровню малонового диальдегида в модельной системе, что считается интегральным показателем, отражающим уровень процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в организме.

Показано [26], что у больных БА образуется замкнутый порочный круг: АФК, генерируемые фагоцитами крови и лаважной жидкости, инициируют ПОЛ, продукты которого стимулируют выброс биологически активных веществ из тучных клеток, что приводит к

усилению атопического воспаления и усилению генерации АФК нейтрофилами и эозинофилами. В результате развивается обострение БА — приступ удушья, который сопровождается гипоксией, усиливающей в свою очередь образование АФК и продуктов ПОЛ [27].

Введение фосфолипидных наночастиц, согласно нулевой гипотезе, может прервать развитие этого патогенетического порочного круга, в первую очередь за счет антиоксидантного действия препарата и репарации поврежденных клеточных мембран, что приводит к замедлению процессов ПОЛ. Таким образом, происходит снижение концентрации АФК и продуктов ПОЛ, что находит свое отражение в динамике АОА плазмы крови.

У всех обследованных пациентов при поступлении в стационар наблюдалось выраженное снижение АОА плазмы крови. В основной группе этот показатель составил  $1,99 \pm 0,32$  отн.ед., в контрольной —  $2,10 \pm 0,39$  отн.ед. ( $p > 0,1$ ; рис. 6).

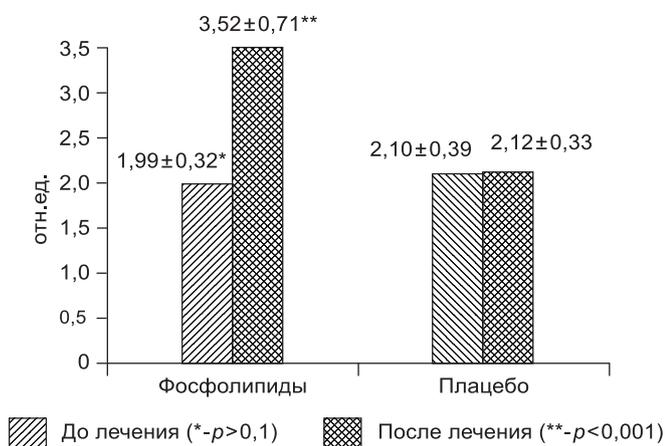
После курса терапии отмечено статистически значимое повышение уровня АОА в основной группе по сравнению с показателями в контрольной группе ( $3,52 \pm 0,71$  и  $2,12 \pm 0,33$  отн.ед.,  $p < 0,001$ ), хотя он и оставался более низким, чем в норме (см. рис. 6).

Завершая изложение результатов исследования эффективности ингаляционного введения фосфолипидных наночастиц в комплексной терапии БА, следует отметить, что при введении препарата ни у одного из полностью выполнивших протокол исследования пациентов не отмечалось значимых побочных эффектов, потребовавших отмены препарата или специального лечения. У 3,45% больных в начале курса лечения отмечено субъективное ощущение затруднения дыхания, не подтвержденное пикфлоуметрически и проходившее самостоятельно после второй или третьей ингаляции препарата. Еще у 12,1% пациентов отмечалось увеличение количества мокроты при отхаркивании, однако к концу периода наблюдения этот симптом также купировался самостоятельно. Никаких изменений показателей объективного обследования пациента, данных лабораторного исследования и ЭКГ не зарегистрировано.

### Заключение

Проведено простое слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование, в котором впервые получены доказательные данные, свидетельствующие о выраженном положительном влиянии ингаляционного введения фосфолипидных наночастиц на динамику основных биомаркеров оксидативного стресса у пациентов, получающих базисную терапию бронхиальной астмы.

Показана эффективность и безопасность ингаляционного введения фосфолипидных препаратов в комплексной терапии бронхиальной астмы в течение дли-



**Рис. 6. Показатели АОА плазмы крови у больных, получающих ингаляции фосфолипидов и плацебо, до начала лечения и после его окончания.**

тельного периода (около трех лет). Указанный метод лечения приводит к статистически значимому позитивному изменению динамики биомаркеров оксидативного стресса при бронхиальной астме, что, безусловно, не может не сказаться положительно на прогнозе течения заболевания с точки зрения патогенеза последнего, хотя для подтверждения этого факта необходи-

мо проведение дополнительных эпидемиологических исследований. Продемонстрированная в настоящем исследовании безопасность длительного применения препарата позволяет рекомендовать использование метода в дополнение к традиционным базисным методам терапии бронхиальной астмы.

#### Сведения об авторах:

**Федеральный научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России**

Лисица Александр Валерьевич (Lisitsa A.V.) — канд. мед. наук, начальник отдела клинических исследований, e-mail: afox03@mail.ru  
Аверьянов Александр Вячеславович (Averyanov A.V.) — д-р мед. наук, проф., зам. ген. директора по научной работе и медицинским технологиям.

**Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России**

Соодаева Светлана Келдибековна (Soodaeva S.K.) — д-р мед. наук, проф., зав. лаб. клинической и экспериментальной биофизики.  
Климанов Игорь Александрович (Klimanov I.A.) — канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаб. клинической и экспериментальной биофизики; e-mail: igorklimanov@yandex.ru

#### Литература

1. Bergamini C.M., Hunte C. Lipids in membrane protein structures. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004; 1666: 2—18.
2. Hanaski Y., Ogawa S., Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 16(6): 845—50.
3. Kagan V.E., Borisenko G.G., Serinkan B.F., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J. et al. Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization and recognition of phosphatidylserine. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003; 85: 1—17.
4. Frew A. J. Asthma biomarkers and drug trials. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109: 210—3.
5. Auroma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6: 593—7.
6. Tampo Y. Studies on membrane factors in iron supported lipid peroxidation. *Yakugaki Zasshi.* 2000; 120: 387—96.
7. Арчаков А.И., Бачманова Г.И., Гусева М.К., Ипатова О.М., Княжев В.А., Лисов В.И. и др. *Композиция, обладающая свойствами репарировать биологические мембраны. Патент РФ № 2133122 от 14.10.1998.*
8. Ипатова О.М. *Фосфогливы: механизм действия и применение в клинике.* М.: Издательство ГУ НИИ БМХ РАМН; 2005.
9. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии (обзор зарубежной литературы). *Пульмонология.* 2002; 2: 57—66.
10. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.* 2008; 32 (2): 472—86.
11. Buszewski B., Kesy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21: 553—66.
12. Corradi M., Pesci A., Casana R. et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide.* 2003; 8: 26—30.
13. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J. et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 523—48.
14. Biernacki W.A., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax.* 2003; 58: 294—8.
15. Gerritsen W.B., Asin J., Zanen P. et al. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir. Med.* 2005; 99: 84—90.
16. Запруднова Е.А. *Изучение динамики метаболитов оксида азота в конденсате выдыхаемого воздуха у детей при атопии.* Дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2002.
17. Хараева З.Ф. *Свободно-радикальный статус фагоцитов больных стафилококковой инфекцией: регуляция иммуноцитокинами и антиоксидантами.* Дисс. д-ра мед. наук. М.; 2003.
18. Кутмин А.И., Марусин А.В. Антиоксидантная активность плазмы крови у лиц с разной дозой редкоизирующего хронического облучения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 1999; 127 (прил. 1): 34—7.
19. Лисица А.В., Соодаева С.К., Климанов И.А., Михайлов С.Е., Аверьянов А.В. Ингалиционные фосфолипидные комплексы в терапии бронхиальной астмы: рандомизированное, плацебо-
- контролируемое исследование. *Клиническая практика.* 2012; 1(9): 15—22.
20. Лисица А.В., Соодаева С.К., Климанов И.А., Михайлов С.Е., Аверьянов А.В., Кузовлев О.П. Опыт применения фосфолипидных препаратов в комплексной терапии бронхиальной астмы. *Клиническая медицина.* 2012; 90(12): 16—21.
21. Global Initiative for Asthma. National Institute of Health, National Heart Lung and Blood Institute, NHLBI/WHO Workshop Report. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention.* NHLBI/WHO Workshop Report n° 02-3659. January 1995, revised 2007.
22. Horvath I., Donnelly L.E., Kiss A. et al. Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide concentrations in asthmatic smokers. *Respiration.* 2004; 71: 463—8.
23. Olin A.C., Rosengren A., Thelle D.S. et al. Height, age and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large general population sample. *Chest.* 2006; 130: 1319—25.
24. Antus B., Barta L., Kullmann T. et al. Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and COPD: a longitudinal study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182 (12): 1492—7.
25. Болевич С.Б., Даниляк И.Г., Коган А.Х. и др. Роль свободнорадикальных процессов в патогенезе бронхиальной астмы. *Пульмонология.* 1997; 1: 18—24.
26. Болевич С.Б. *Роль свободнорадикальных процессов в патогенезе бронхиальной астмы.* Дисс. ... д-ра мед. наук. М.; 1995.
27. Buszewski B., Kesy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21: 553—66.

#### REFERENCES

1. Bergamini C.M., Hunte C. Lipids in membrane protein structures. *Biochem. Biophys. Acta.* 2004; 1666: 2—18.
2. Hanaski Y., Ogawa S., Fukui S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* 1994; 16(6): 845—50.
3. Kagan V.E., Borisenko G.G., Serinkan B.F., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J. et al. Appetizing rancidity of apoptotic cells for macrophages: oxidation, externalization and recognition of phosphatidylserine. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003; 85: 1—17.
4. Frew A. J. Asthma biomarkers and drug trials. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2002; 109: 210-3.
5. Auroma O.I., Halliwell B., Hoey B.M., Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine. *Free Radic. Biol. Med.* 1989; 6: 593—7.
6. Tampo Y. Studies on membrane factors in iron supported lipid peroxidation. *Yakugaki Zasshi.* 2000; 120: 387—96.
7. Archakov A.I., Bachmanova G.I., Guseva M.K., Ipatova O.M., Knyazhev V.A., Lisov V.I. et al. *Biomembranes Repair Composition. Patent RF N 2133122, 14.10.1998.* (in Russian)
8. Ipatova O.M. *Phosphoglyv: Mechanism of Efficacy and Clinical Approach.* Moscow: Izdatel'stvo GU NII BMKH RAMN; 2005. (in Russian)
9. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Exhaled breath condensate investigation in pulmonology practice (foreign literature review). *Pul'monologiya.* 2002; 2: 57—66. (in Russian)
10. Borrill Z.L., Roy K., Singh D. Exhaled breath condensate biomarkers in COPD. *Eur. Respir. J.* 2008; 32 (2): 472—86.

11. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21: 553—66.
12. Corradi M., Pesci A., Casana R. et al. Nitrate in exhaled breath condensate of patients with different airway diseases. *Nitric Oxide.* 2003; 8: 26—30.
13. Horvath I., Hunt J., Barnes P.J. et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur. Respir. J.* 2005; 26: 523—48.
14. Biernacki W.A., Kharitonov S.A., Barnes P.J. Increased leukotriene B4 and 8-isoprostane in exhaled breath condensate of patients with exacerbations of COPD. *Thorax.* 2003; 58: 294—8.
15. Gerritsen W.B., Asin J., Zanen P. et al. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir. Med.* 2005; 99: 84—90.
16. Zaprudnova E.A. *Investigation of Nitric Oxide Metabolites in Exhaled Breath Condensate in Atopic Children.* Diss. Moscow; 2002. (in Russian)
17. Kharaeva Z.F. *Phagocytes Free Radical Status in Patients With Staphylococcus Infection: Immunocytokines and Antioxidant Regulation.* Diss. Moscow; 2003. (in Russian)
18. Kutmin A.I., Marusin A.V. Blood plasma antioxidant activity in patients with different doses of rare-ionized chronic radiation exposure. *Byulleten' experimental'noy biologii i meditsiny.* 1999; 127 (прил. 1): 34-7. (in Russian)
19. Lisitsa A.V., Soodaeva S.K., Klimanov I.A., Mikhaylov S.E., Averyanov A.V. The phospholipids nanoparticle inhalation in patient with bronchial asthma: randomized, placebo-controlled study. *Klinicheskaya praktika.* 2012; 1(9): 15—22. (in Russian)
20. Lisitsa A.V., Soodaeva S.K., Klimanov I.A., Mikhaylov S.E., Aver'yanov A.V., Kuzovlev O.P. The phospholipids inhalation in bronchial asthma therapy. *Klinicheskaya meditsina.* 2012; 90(12): 16—21. (in Russian)
21. Global Initiative for Asthma. National Institute of Health, National Heart Lung and Blood Institute, NHLBI/WHO Workshop Report. *Global Strategy for Asthma Management and Prevention.* NHLBI/WHO Workshop Report n° 02-3659. January 1995, revised 2007.
22. Horvath I., Donnelly L.E., Kiss A. et al. Exhaled nitric oxide and hydrogen peroxide concentrations in asthmatic smokers. *Respiration.* 2004; 71: 463—8.
23. Olin A.C., Rosengren A., Thelle D.S. et al. Height, age and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large general population sample. *Chest.* 2006; 130: 1319—25.
24. Antus B., Barta I., Kullmann T. et al. Assessment of exhaled breath condensate pH in exacerbations of asthma and COPD: a longitudinal study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010; 182 (12): 1492—7.
25. Bolevich S.B., Danilyak I.G., Kogan A.Kh. et al. The role of free radical processes in bronchial asthma pathogenesis. *Pul'monologiya.* 1997; 1: 18—24. (in Russian)
26. Bolevich C.B. *The Role of Free Radical Processes in Bronchial Asthma Pathogenesis.* Diss. Moscow; 1995. (in Russian)
27. Buszewski B., Keszy M., Ligor T., Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed. Chromatogr.* 2007; 21: 553—66.

Поступила 29.04.14  
Received 29.04.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.379-008.64-06:616.153.455-008.64]-085.357-07

## КАЧЕСТВО ЖИЗНИ И ПРОБЛЕМЫ, СВЯЗАННЫЕ С ГИПОГЛИКЕМИЕЙ, У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2-ГО ТИПА НА ФОНЕ БАЗИС-БОЛЮСНОЙ ТЕРАПИИ ИНСУЛИНОМ

Ионова Т.И.<sup>1,2</sup>, Один В.И.<sup>3</sup>, Никитина Т.П.<sup>1,2</sup>, Курбатова К.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова», 105203 Москва;

<sup>2</sup>РОО «Международный центр исследования качества жизни», 191014 Санкт-Петербург;

<sup>3</sup>ФГБВОУ «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова», 194044 Санкт-Петербург

*Представлены результаты, полученные в рамках наблюдательной программы «Показатели качества жизни, симптомы гипогликемии и удовлетворенность лечением у больных сахарным диабетом второго типа, получающих базис-болюсную терапию инсулином» (2012—2014 гг.). В анализ включено 1000 больных сахарным диабетом 2-го типа (СД2), получающих базис-болюсную терапию инсулином. Показано, что качество жизни больных СД2 ниже популяционной нормы; в большей степени у больных выражено нарушение физического, ролевого физического и ролевого эмоционального функционирования ( $p < 0,001$ ). Гипогликемия является серьезной проблемой при ведении больных СД2, получающих базис-болюсную терапию инсулином. Показатели физического, психологического и социального функционирования у больных СД2, испытывавших эпизоды гипогликемии, ниже, чем у больных СД2 без гипогликемии ( $p < 0,01$ ). Показатели качества жизни у пациентов с легкими эпизодами гипогликемии и у пациентов без гипогликемии различаются незначительно. У пациентов с тяжелыми эпизодами гипогликемии показатели качества жизни существенно ниже, чем у пациентов с легкими эпизодами гипогликемии. Профиль симптомов гипогликемии различается при разных формах гипогликемии. Спектр симптомов и проблем, связанных с гипогликемией, более выражен у пациентов, испытывающих тяжелые и/или ночные эпизоды гипогликемии. В группе пациентов без гипогликемии меньше выражен страх возникновения гипогликемии, чем в группе пациентов с эпизодами гипогликемии ( $p < 0,001$ ). Чем сильнее выражен страх возникновения гипогликемии у больных СД2, тем больше нарушение социального функционирования и психического здоровья, ниже показатели жизнеспособности и общего здоровья ( $p = 0,0001$ ). Изучение показателей качества жизни и симптомов, связанных с гипогликемией, у больных СД2 на фоне базис-болюсной терапии инсулином позволяет комплексно оценивать эффект проводимой терапии с учетом оценок, сделанных пациентом.*

*К л ю ч е в ы е с л о в а:* сахарный диабет 2-го типа; базис-болюсная терапия инсулином; качество жизни; симптомы; гипогликемия.

### QUALITY OF LIFE AND HYPOGLYCEMIA BURDEN IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS ON BASAL-BOLUS INSULIN THERAPY

Ionova T.I.<sup>1,2</sup>, Odin V.I.<sup>3</sup>, Nikitina T.P.<sup>1,2</sup>, Kurbatova K.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.I. Pirogov National Medico-Surgical Centre, Moscow; <sup>2</sup>International Centre for Quality of Life Studies, Sankt-Peterburg;

<sup>3</sup>S.M. Kirov Military Medical Academy, Sankt-Peterburg

*This paper presents the results of the observational program «Parameters of life quality, symptoms of hypoglycemia and treatment satisfaction in patients with type 2 diabetes mellitus on basal-bolus insulin therapy» (2012-2014). The analysis included 1000*