

Нижегородская медицинская академия

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор по научной работе НГМА
д.м.н. профессор

Б.Е.Шахов

« 5 » 11 1999г.

О Т Ч Е Т

“Клиническая оценка антиоксидантной активности
биологически активной добавки к пище «БИОСКАН С».

Часть 1

К договору о сотрудничестве с ООО “РОСБИОПРОМ” (г. Саров).

Ответственный исполнитель:

Зав.каф. клинической лабораторной
диагностики ИПО НГМА

д.б.н. профессор

К.Н.Конторщикова

« 5 » 11 1999г.

Нижний Новгород
1999 г.

Оценка эффективности препарата «Биоскан С» у больных с аллергическими заболеваниями.

Богданова Т.А., Ермолаева Е.В., Кубышева Н.И., Лазарева Л.Г., Нижегородская медицинская академия, Больница № 27 «Айболит», ООО «Росбиопром».

Бронхиальная астма (БА) является одной из наиболее актуальных проблем пульмонологии в педиатрии. С современных позиций патогенеза БА расценивается как аллергическое воспаление дыхательных путей.

К настоящему времени картина аллергического воспаления при БА воспринимается как очередность событий, инициирования распознаванием иммуноглобулинами класса E аллергена и последующей активацией и селективным рекрутированием клеток-эффекторов воспаления. Указанный процесс начинается с взаимодействия IgE и Fcε-R1 и Fcε-R2-несущими клетками. Известно, что максимальную аффинность имеют IgE-рецепторы тучных клеток (ТК), играющих одну из ведущих ролей в аллергическом воспалении.

После связывания аллергеном двух молекул IgE происходит стягивание Fcε-рецепторов на мембране ТК, их активация, сопровождающаяся сложными быстротекущими ферментативными процессами: инфлюкс Ca^{2+} внутрь клеток-«мишеней», высвобождение различных медиаторов, в том числе - гистамина, серотонина, кининов, фактора активации тромбоцитов (ФАТ) и метаболитов арахидоновой кислоты - лейкотриенов и простагландинов. Они представляют собой активные соединения, большая часть которых является мощными бронхоконстрикторами, вызывают повышение сосудистой проницаемости, секрецию вязкой мокроты, усугубление бронхообструкции и, тем самым, инициирующих и поддерживающих воспалительный процесс.

В развитии аллергического воспаления особая роль принадлежит также Т-лимфоцитам. В их функцию входит распознавание антигена, запуск реакций клеточного и гуморального иммунитета, продукция лимфокинов. Известно, что антигенная активация Т-клеток ведет к продукции интерлейкина-2 (ИЛ-2) и экспрессии его рецепторов, что служит признаком активации данных лимфоцитов и подготовки их к пролиферации. Клетки, несущие на своей поверхности рецептор к ИЛ-2 (ИЛ-2-R), в международной классификации относятся к CD25+лимфоцитам. Существуют исследования, утверждающие, что при воспалении, в том числе при бронхиальной астме количество CD25+лимфоцитов увеличено, что свидетельствует о функциональной активности данных клеток.

В настоящее время в развитии БА придается особое значение таким субпопуляциям Т-лимфоцитов, как CD4+, отвечающих в основном за хелперно/индукторную функцию, и CD8+, или цитотоксическим клеткам. Активация Т-хелперных лимфоцитов (Тх) является определяющим фактором тяжести течения БА, бронхиальной гиперреактивности.

В оценке аллергического воспаления, лежащего в основе бронхиальной астмы, существенное место занимает изучение функциональной активности гранулоцитов. Известно, что в ходе IgE-опосредованного аллергического воспаления в дыхательных путях формируется лейкоцитарный инфильтрат, в состав которого помимо прочих клеток входят гранулоциты: в инициальный период нейтрофилы, сменяющиеся затем эозинофилами. Формирование инфильтрата происходит вслед за IgE-зависимой стимуляцией тучных клеток, что приводит к дестабилизации медиаторных систем, повышению хемотаксического градиента для гранулоцитов, их активацией и последующему проникновению в очаг воспаления. Известно, что эти клетки являются одновременно мишенями и эффекторами в аллергическом воспалении, в связи с чем, реализация их эффекторного потенциала является значимой при БА. Одним из механизмов реализации эффекторного потенциала нейтрофилов и эозинофилов является продукция ими активных метаболитов кислорода (АФК) с высоким повреждающим действием, что методически можно зафиксировать с помощью люминолзависимой хемилюминесценции.

Клиническим проявлением аллергического воспаления при БА является бронхиальная гиперреактивность для оценки которой используются методы функциональной диагностики внешнего дыхания. Учитываются такие показатели функции внешнего дыхания как объем выдоха в первую секунду (ОФВ1), максимальные объемные скорости потока в точках, соответствующих объему легких 25%, 50%, 75% форсированной жизненной емкости легких (МОС25, МОС50, МОС75). Эти показатели важны для определения локализации нарушений в дыхательных путях на уровне крупных, средних или мелких бронхов. Фиксируется также максимальный среднеэспираторный поток (или средняя скорость выдоха) -ММЕФ. Преимуществом оценки кривой «поток-объем» заключается в том, что график наглядно показывает изменение потока на различных уровнях бронхов. По форме кривой можно оценить локализацию респираторных нарушений и оценить их тяжесть.

Наряду с определением основных показателей функции внешнего дыхания целесообразно ежедневно оценивать графики ПФМ, рассчитывать показатель среднесуточной бронхиальной проходимости (СБП) и показатель среднесуточных колебаний пиковой скорости выдоха (ПСВ). Последний показатель считается наиболее важным для контроля за лечением БА, поскольку он отражает лабильность тонуса бронхиального дерева (бронхиальную гиперреактивность), соответствующую степени выраженности воспалительного процесса при БА.

Основными препаратами детской астмологии, коррегирующие механизм аллергического воспаления являются препараты кромоновой группы – кромогликат натрия (интал) и недокромил натрия (тайлед).

Длительный опыт применения кромоновых препаратов для контроля бронхиальной астмы за последние 25 лет доказал их высокую клиническую эффективность, подтвердившими, что они являются препаратами выбора при проведении лечения, направленного на торможение активности клеток-участников аллергического воспаления.

Известно, что как кромогликат, так и недокромил натрия имеют бензопирановую группировку хиноидной природы. Аналогичная группировка присутствует и в химической формуле дигидрохверцетина – в биологически активной добавке «*Биоскан С*». Можно предположить, что обладает такими фармакологическими свойствами как интал и тайлед. В связи с этим, целью настоящего исследования явилось изучение эффективности «*Биоскан С*» у больных детей бронхиальной астмой.

Материалы и методы исследования:

Были обследованы 22 ребенка в возрасте от 1 года до 10 лет с различными проявлениями респираторной аллергии. У 75% больных бронхиальная астма (БА) сочеталась с кожными проявлениями аллергии (экзема, нейродермит), у 6% детей выявлены только проявления аллергодерматоза, у 11% наблюдались другие проявления респираторной аллергии (аллергические бронхиты, риниты).

Диагноз БА установлен в пульмонологическом отделении согласно рекомендациям Национальной программы «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика» (Москва, 1997). Проведено полное обследование, позволившее выявить особенности клинической картины БА, верификацию причинно-значимых аллергенов, оценку параметров функции внешнего дыхания по показателям кривой поток-объем с помощью компьютерного спироанализатора Microspiro (Япония), а также определение показателей пикфлоуметрии (ПФМ). У всех детей, поступивших в стационар, отмечалось обострение аллергического процесса, выразившееся клиникой бронхообструкции или усилением кожных проявлений (зуд, гиперемия, мокнутие). У 16% детей обострение аллергоза было ассоциировано с присоединением интеркуррентных инфекций. В соответствии со степенью тяжести была назначена базисная терапия (кромоновые препараты или ингаляционные ГКС) и топические стероидные мази при кожных проявлениях. Особенности анамнеза (ранний дебют заболевания, четкая связь обострения с инфекциями, отягощенный акушерский анамнез, торпидность к традиционной терапии) послужили поводом к обследованию на наличие фрагментов

генома (ФГ) внутриклеточных патогенов (микоплазмы, хламидии, цитомегаловирусы, герпес). У 80% детей результат оказался положительным.

Оценка иммунологического статуса включала определение общего количества Т- и его субпопуляций – CD4+, CD8+, CD25+, уровня иммуноглобулинов А, М, G, Е. Неспецифическое звено иммунитета исследовали путем определения функциональной активности гранулоцитов периферической крови по индуцированной хемилюминесценции.

С целью выделения лимфоцитов гепаринизированная кровь разводилась 1:2 с забуферным фосфатным раствором (ЗФР) и наслаивалась на равный объем 15,2% раствора верографина с плотностью 1,076 г/см³. Центрифугирование проводилось в течение 45 мин. при 1500 об/мин. Лимфоциты из интерфазы переносились в пробирку, затем дважды отмывались ЗФР и разводились до концентрации 2×10^6 в 1 см³. Для определения общих Т-лимфоцитов к 0,1 мл суспензии добавляли 0,1 взвеси эритроцитов барана. Далее полученные смеси инкубировали в термостате в течение 10 мин при температуре 37 С. Через 10 мин клетки осаждались центрифугированием и в течение часа выдерживались при температуре 4С. Затем образовавшиеся розетки фиксировались 3% глютаральдегидом в течение 20 мин. в мазке, окрашенном по Браше, подсчитывалось число лимфоцитов, присоединивших 3 и более эритроцитов барана.

Определение CD4+, CD8+, CD25+ лимфоцитов проводилось с помощью набора моноклональных антител производства Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РФ на люминесцентном микроскопе «Leitz» (Германия).

Количественное определение иммуноглобулинов А,М,G проводилось методом радиальной иммунодиффузии по Манчини с использованием моноспецифических сывороток против IgA, IgM, IgG производства Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РФ. Принцип основан на измерении кольца преципитации, образующегося при внесении исследуемой сыворотки в лунки агара, в котором предварительно диспергирована моноспецифическая антисыворотка. Диаметр кольца преципитации прямо пропорционален концентрации исследуемого иммуноглобулина. Содержание иммуноглобулинов определяли относительно стандартной сыворотки крови человека с известной концентрацией иммуноглобулинов. Результаты исследований выражались в г/л.

Определение общего иммуноглобулина Е проводилось иммуноферментным методом с использованием тест-систем фирмы «БИОИММУНОГЕН» на иммуноферментном анализаторе «MR 5000» фирмы «Dynatech» (Германия).

Функциональную активность гранулоцитов оценивали по интенсивности хемилюминесцентного ответа этих клеток в ответ на стимул на приборе “Dynatech” (Германия).. Для этого лейкоциты выделяли из венозной крови по методике, описанной Коганом А.Х. и др. [31]. Лейковзвесь содержала $0,4 \times 10^6$ лейкоцитов в 200 мкл физ.раствора. Концентрация люминола составляла 10^{-3} М в дозе 0,02 мл, в качестве стимулятора использовали опсонизированный зимозан (0,02 мл) и ФАТ (0,02 мл, 10^{-6} М). Полученные результаты выражались в относительных люминесцентных единицах (отн.люм.ед.)

Результаты исследования и их обсуждение:

После проведенного лечения при оценке клинической эффективности было выявлено следующее:

Сократилась продолжительность приступов бронхиальной астмы (в среднем до 2-3 дней), уменьшилась потребность препаратов, как для базисной терапии, так и в urgentных ситуациях. К концу двухнедельного курса у 2-х детей были отменены ингаляционные глюкокортикостероиды. При сочетании астмы с аллергодерматозами установлено стихание активности кожного процесса (уменьшение зуда, гиперемии), по времени опережающего динамику изменений со стороны респираторного тракта, что, вероятно, объясняется энтеральным приемом «Биоскан С». Достигнутый результат был достаточно стабилен и позволил отказаться у 83% больных от отмены кожных кортикостероидных мазей. Выявлены улучшение параметров функций внешнего дыхания в среднем через 1 неделю после начала лечения, а также значительное улучшение качества жизни (отсутствие ночных эквивалентов астмы, снижение специфической бронхиальной

гиперреактивности и др.). На фоне приема «Биоскан С» отмечалось более легкое течение вирусных инфекций, если по времени они совпадали с применением препарата, что выражалось в уменьшении длительности лихорадки, снижении интоксикации, улучшении показателей гемограммы. Ни у одного из детей, перенесших ОРВИ на фоне «Биоскан С» инфекционный процесс не вызвал обострения астмы.

Результаты проведенных исследований по оценке функции внешнего дыхания показали, что до начала лечения практически у всех больных выявлялись признаки нарушения бронхиальной проходимости (нарушения по обструктивному или- реже смешанному типу) , что отражалось на снижении показателей максимальных объемных скоростей потока на уровне бронхов различного калибра, а также снижения максимального среднеэспираторного потока (или среднего потока выдоха- MMEF (данные представлены в табл. 1).

Таблица 1.
Динамика показателей функции внешнего дыхания (ФВД) на фоне приема «Биоскан С».

Параметры ФВД (%)	До лечения	После лечения
ОФВ1	91±2,3	101±1,0
MMEF	85±1,4	92±2,7
МОС25	70±3,6	95±4,1
МОС50	55±2,8	90±3,4
МОС75	72±5	94±2,6

Спирометрические тесты выявили снижение нарушения бронхиальной проходимости на уровне периферических бронхов (МОС75) до лечения у всех больных старше 5 лет.

Через 2-3 недели после начала лечения с применением препарата «Биоскан С» отмечено существенное улучшение или нормализация спирографических показателей. Наиболее динамичные изменения установлены при оценке бронхиальной проходимости на уровне бронхов среднего калибра, в то время как спирометрические показатели на уровне периферических бронхов (МОС 75) у 56% обследованных детей нормализовались

Параметры ПФМ через 2-3 недели от начала лечения по показателям среднесуточного колебания ПСВ составили 12,6%, что косвенно отражало сохранение латентной бронхиальной гиперреактивности. В этой группе «классические» признаки атопии были выражены значительно слабее, у больных отмечались очаги инфекции ЛОР-органов и явления аллергодерматозов, часто с присоединением инфекции. При проведении функциональных легочных тестов у 3 больных появлялась кашлевая реакция на физическую нагрузку. Эти данные свидетельствуют о сохранении в этой группе больных неспецифической бронхиальной гиперреактивности с повышением чувствительности ирритантных рецепторов, сохранении «нейрогенного» компонента аллергического воспаления на фоне вяло персистирующих очагов инфекции. Все это необходимо учитывать при определении стратегии иммуномодулирующей терапии и длительности ее проведения.

При оценке иммунологического статуса у детей больных БА до применения «Биоскан С» средневыборочные значения интенсивности генерации активных форм кислорода в тесте люминолзависимой хемилюминесценции были достоверно повышенными по сравнению с нормой (табл.2).

Таблица 2.

Интенсивность хемилюминесцентного (ХЛ) ответа (отн.люм.ед.) гранулоцитов у детей больных бронхиальной астмой до и после применения «Биоскан С».

	ХЛ (дети с бронхиальной астмой)	ХЛ (здоровые дети)
До лечения	0,1857±0,0368*	0,0520±0,0065
После лечения	0,0873±0,0167	

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с нормой.

Однако, у 30% больных было выявлено снижение функциональной активности гранулоцитов в тесте люминолзависимой хемилюминесценции – $0,0247 \pm 0,0072$ отн.люм.ед. по сравнению с нормальными показателями, что характеризует истощение функциональной активности клеток гранулоцитарного звена в условиях хронического персистирующего воспаления; для остальных больных было характерно значительное увеличение интенсивности хемилюминесцентного ответа – $0,3421 \pm 0,0675$ отн.люм.ед. Высокие показатели ХЛ свидетельствуют об усиленной активации гранулоцитов у больных БА, их высокой эффекторной потенции. Известно, что клетки, участвующие в аллергическом воспалении выделяют каскад биологически активных веществ, способных усиливать или ослаблять функциональные возможности клеток. В данном случае, видимо, эти медиаторы воспаления активизируют гранулоцитарные клетки, что находит свое отражение в хемилюминесцентном ответе данных клеток.

После 2-3 недельного курса применения «Биоскан С» было установлено в среднем снижение генерации активных форм кислорода - $0,0873 \pm 0,0167$ при этом у 78% (17 чел.) больных происходила нормализация функциональной активности гранулоцитов ($0,0528 \pm 0,0112$, а у 15 % (3 чел.) больных, имеющие исходно высокий уровень генерации активных форм кислорода – тенденция к понижению интенсивности хемилюминесцентного ответа гранулоцитов. Вполне вероятно, «Биоскан С» обладает модулирующими свойствами, нормализуя функциональные возможности клеток гранулоцитарного звена.

Результаты количественного содержания Т-клеточного звена иммунитета до и после применения «Биоскан С» представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Количественное содержание CD4+, CD25+, общего количества Т- лимфоцитов (%) у больных бронхиальной астмой до и после применения «Биоскан С».

Параметры Клеточного Иммунитета		Больные дети	здоровые дети
CD4+	До лечения	41,3±10,1	50,1±2,5
	После лечения	45,8±6,7	
CD25+	До лечения	15,6±6,2*	4±1
	После лечения	8,4±2,9	
Т-лимфоциты	До лечения	45,8±7,1*	63,1±1,8

	После лечения	58,3±2,5	
--	---------------	----------	--

* - достоверность различий относительно нормы ($p < 0,05$).

Анализ исследований определения содержания клеточного иммунитета показал, что у 85% (18 чел.) больных наблюдается снижение CD4+ лимфоцитов ($33,2 \pm 5,6\%$), что, видимо, может объясняться миграцией этих клеток в очаг повреждения и свидетельствует о хроническом персистирующем воспалении. После приема «Биоскан С» наблюдалось увеличение уровня CD4+лимфоцитов в среднем на 38% у большинства больных с положительным клиническим результатом.

При исследовании количественного содержания CD8+ лимфоцитов было установлено, что до применения препарата «Биоскан С» у 64% (14 чел.) уровень CD8+клеток составлял $38,3 \pm 3,2$, что на 29% повышено по сравнению с нормой, у остальных (8 чел.) выявлено снижение количества этих клеток $-11,5 \pm 3,7\%$. После применения «Биоскан С» у большинства больных отмечена тенденция к нормализации показателей как CD8+.

Содержание CD25+клеток в начале лечения у всех больных в среднем составлял $15,6 \pm 6,2\%$, что в 2-4 раза превышает нормальные значения. После курса лечения «Биоскан С» выявлено понижение количества этих клеток, что, вероятно, свидетельствует о стабилизации функциональной активности Т-лимфоцитов и снижении общего воспалительного процесса.

Как видно из табл.2, практически у всех детей до приема «Биоскан С» отмечалось достоверное снижение общего количества Т-лимфоцитов ($45,8 \pm 7,1\%$) по сравнению с нормальными показателями, как правило, свойственное для воспалительного процесса в результате миграции этих клеток из периферической крови в шоковый орган..

После включения исследуемого препарата в терапевтический комплекс лечения отмечалась тенденция к увеличению содержания Т-лимфоцитов у большинства детей.

Что же касается изучения показателей гуморального иммунитета в нашем исследовании, в первую очередь следует подчеркнуть, что для 83% обследованных больных исходно было характерно увеличение уровня IgE - 345 ± 78 МЕ/мл, что характерно для атопического процесса. У 73% больных наблюдалось снижение IgA. Применение «Биоскан С» в течение 2-3 недель никак не повлияло на какие-либо сдвиги в отношении иммуноглобулина класса Е. В то же время, у 7 больных наблюдалось заметная тенденция к нормализации содержания уровня IgA.

Исходя из вышеописанных результатов отчетливо заметно, что применение «Биоскан С» способствует нормализации функциональной активности гранулоцитов и Т-лимфоцитов и стабилизации содержания отдельных показателей клеточного и гуморального звена иммунитета.

Заключение:

Таким образом, «Биоскан С» является высокоэффективным препаратом, который может быть использован для лечения детей с аллергическими заболеваниями. Препарат обладает свойствами иммуномодулятора, расширяя возможности фармакологического контроля аллергического воспаления. Применение «Биоскан С» позволяет уменьшить объем суммарной медикаментозной нагрузки, улучшает качество жизни больных, способствует удлинению ремиссии заболевания, позволяет повысить устойчивость к вирусным заболеваниям. Несомненным достоинством препарата является возможность контроля не только респираторных, но и кожных проявлений аллергии.

В условиях экологического неблагополучия, способствующего росту внутриклеточной патологии, что отягощает течение аллергических заболеваний, несомненно интересным оказался факт эффективности препарата «Биоскан С» у больных с персистирующей внутриклеточной инфекцией. В связи с этим, мы считаем целесообразным проведение исследований в этом направлении и возможное расширение показаний применения препарата в этой группе больных.

Вместе с тем, сохраняющаяся к концу 2-3 недельного курса бронхиальная гиперреактивность делает целесообразным рассмотрение вопроса о более длительном курсе лечения данным препаратом. Следует также учитывать, что наиболее оптимальные результаты получены у больных, которым «Биоскан С» был назначен после санации очагов бактериальной инфекции. Все это позволяет определить место «Биоскан С» в фазе «базисной» терапии аллергических заболеваний.