

На правах рукописи

Есимова Ирина Евгеньевна

**СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОЙ ФАЗЫ МЕМБРАНЫ МОНОНУКЛЕАРНЫХ
КЛЕТОК КРОВИ ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ ЛЕГКИХ**

14.00.16 – патологическая физиология
03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2007

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научные руководители:

доктор медицинских наук,
профессор, академик РАМН,
Заслуженный деятель науки РФ

**Новицкий
Вячеслав Викторович**

доктор медицинских наук

**Уразова
Ольга Ивановна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры биохимии и
молекулярной биологии
ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава

**Федорова
Татьяна Сергеевна**

кандидат медицинских наук,
старший научный сотрудник,
старший научный сотрудник отдела
лекарственной токсикологии
ГУ НИИ фармакологии ТНЦ СО РАМН

**Фомина
Татьяна Ивановна**

Ведущая организация:

ФГУ Новосибирский НИИ туберкулеза Росмедтехнологий, г. Новосибирск

Защита состоится « ____ » _____ 2007 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (634050, Томск, ул. Московский тракт, 2)

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава (634050, Томск, пр. Ленина, 107)

Автореферат разослан « ____ » _____ 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Суханова Г.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Изменение социально-экономической обстановки в России привело к ухудшению эпидемиологической ситуации по туберкулезу. В клиническую классификацию туберкулеза в 1994 году были вновь внесены тяжелые его формы, многие годы не встречавшиеся в человеческой популяции, к примеру, казеозная пневмония, милиарный туберкулез легких и лекарственно-устойчивые формы легочного туберкулеза, характеризующиеся остро прогрессирующим течением и неблагоприятным прогнозом. Среди различных факторов, обуславливающих появление такого рода клинических форм туберкулезной инфекции, наряду со снижением общей реактивности организма и изменением молекулярно-биологических свойств инфекционного возбудителя, определенную роль, по данным ВОЗ, играет снижение объема профилактических мероприятий и целевых осмотров населения [Баласанянц Г.С., 1999; Степаншина В.Н. и соавт., 2000; Тунгусова О.С., Марьяндышев А.О., 2001; Мишин В.Ю., 2002; Приймак А.А., 2005].

Лекарственно-устойчивый туберкулез легких (ЛУТЛ) представляет собой вариант туберкулезной инфекции, вызванной микобактериями туберкулеза (МБТ), резистентными к действию противотуберкулезных препаратов (ПТП). Из-за отсутствия эффекта лечения больные ЛУТЛ длительное время остаются бактериовыделителями, обеспечивая тем самым высокий риск распространения лекарственно-резистентного возбудителя среди окружающего населения. По данным ГУ ЦНИИ туберкулеза РАМН, у каждого второго впервые выявленного больного туберкулезом легких в мокроте выявляются лекарственно-резистентные МБТ (ЛР-МБТ), при этом почти в 30% случаев резистентность устанавливается к 2–3 и более препаратам. При хроническом диссеминированном и фиброзно-кавернозном туберкулезе легких ЛР-МБТ определяются более чем у 90% пациентов [Мишин В.Ю., 2002; 2004].

Исходя из инфекционно-аллергической концепции патогенеза туберкулеза, современные исследователи в качестве одной из основных причин отрицательного патоморфоза туберкулеза, наряду с лекарственно-индуцированной изменчивостью МБТ-генома, выделяют генетически детерминированные и приобретенные нарушения иммунологической реактивности организма-хозяина. Ведущая роль в обеспечении противотуберкулезной защиты макроорганизма, как известно, принадлежит тканевым и циркулирующим фагоцитам – альвеолярным макрофагам, моноцитам и полиморфноядерным нейтрофилам, а также индукторам иммунного воспаления – лимфоцитам. При этом наиболее значимым фактором дизрегуляции иммунных процессов при туберкулезе, по данным ряда авторов, является структурно-функциональная дестабилизация мембран лейкоцитарных клеток крови [Pilheu D.J. et al., 1995; Адамбеков Д.А. и соавт., 1998; Кноринг Б.Е. и соавт., 1998, 1999; Хонина Н.А. и соавт., 2000; Доценко Э.А. и соавт., 2001; Симонова А.В., 2002].

К настоящему времени установлено, что цитоплазматическая мембрана (ЦПМ) является одной из наиболее чувствительных к инфекционному воздействию структур клетки. Мембране отводится ключевая роль в детерминации нормального функционирования отдельных клеточных органелл и клетки в целом. Согласованная работа мембранных механизмов клетки в значительной мере определяет ее способность тонко реагировать не только на воздействие факторов внешней среды, но и на изменения внутренней среды макроорганизма [Сим Э., 1982; Болдырев А.А., 1987; Рязанцева Н.В. и соавт., 2004; Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., 2004]. Нарушения структурно-функциональных свойств ЦПМ могут отражаться на состоянии процессов клеточного метаболизма, гомеостатической функции и

времени жизни клеток. В частности, абсолютно доказанным на сегодняшний день является факт негативного влияния мембраноповреждающих агентов на апоптоз [Порядин Г.В. и соавт., 1998; Рыжов С.В., Новиков В.В., 2002; Черных Е.Р. и соавт., 2002].

Известно, что основу структурной организации клеточных мембран составляет липидный бислой с асимметрично встроенными белками. Специфическая укладка полипептидных цепей интегральных и периферических белков определяется и стабилизируется окружающими их липидными молекулами. Изменение липидного спектра ЦПМ при развитии патологических процессов может приводить к ее структурным перестройкам, нарушению работы мембраносвязанных ферментных систем, ионных каналов и насосов и в дальнейшем к трансформации, метаболическому и функциональному дисбалансу клетки [Владимиров Ю.А., 1989; Колосова М.В., 1999; 2001; Степовая Е.А., 1999; Кузьмичева Л.В. и соавт., 2005; Убайдуллаев С.А. и соавт., 2005; Вязова А.В., 2006].

Вместе с этим, необходимо отметить, что сведения о структурных и функциональных изменениях мембраны лейкоцитарных клеток крови при туберкулезе и действии противотуберкулезных лекарственных препаратов в доступной литературе крайне немногочисленны и носят, как правило, сугубо описательный характер, что затрудняет объяснение механизмов иммунного дисбаланса и не позволяет проводить эффективную патогенетически обоснованную профилактику и коррекцию иммунных нарушений, возникающих у больных туберкулезом, в частности, в период проведения бактериостатической полихимиотерапии. Напротив, установление механизмов нарушений структурного состояния ЦПМ клеток крови при действии МБТ, а также в условиях противотуберкулезной терапии микобактериальной инфекции несомненно расширит представление о патогенезе туберкулеза и механизмах иммунодепрессивного действия МБТ и антимикобактериальных препаратов и, возможно, послужит основой для разработки более эффективных методов диагностики и прогнозирования туберкулезной инфекции, а также коррекции сопровождающих её течение иммунотоксических нарушений.

Цель исследования: выявить общие закономерности, особенности и механизмы реорганизации липидного бислоя мембраны мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких до и в процессе специфической терапии.

Задачи исследования:

1. Оценить микровязкость, липидный спектр мембраны, активность перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты в мононуклеарах периферической крови у лиц в возрасте от 20 до 55 лет, страдающих распространенным деструктивным лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым (инфильтративным, диссеминированным, фиброзно-кавернозным) туберкулезом легких.
2. Выявить особенности и механизмы модифицирования структуры липидной фазы мембраны мононуклеарных лейкоцитов периферической крови при туберкулезе легких в зависимости от клинической формы и варианта (лекарственно-чувствительный или лекарственно-устойчивый) заболевания.
3. Провести сравнительную оценку микровязкости, липидного состава мембраны, активности перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты в лимфоцитах и моноцитах периферической крови у больных туберкулезом и хронической обструктивной болезнью легких.
4. Охарактеризовать изменения структуры липидного бислоя мембраны, активности перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов в мононуклеарных лей-

коцитах периферической крови при туберкулезе легких в процессе туберкулостатической химиотерапии.

Научная новизна. Проведена комплексная оценка изменений липидной фазы мембраны, активности перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у лиц в возрасте 20-55 лет при различных клинических формах лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого распространенного деструктивного туберкулеза легких до лечения и на фоне проведения противотуберкулезной химиотерапии. Получены новые знания фундаментального характера, показывающие снижение микровязкостных свойств (увеличение коэффициентов эксимеризации пирена в анулярном и общем липидном бислое) и изменение фосфолипидного спектра (увеличение количества фосфатидилэтаноламина, фосфатидилинозитола и снижение уровня фосфатидилхолина и сфингомиелина) мембраны лимфоцитов и моноцитов периферической крови, которые являются однонаправленными при лекарственно-чувствительном и лекарственно-устойчивом туберкулезе легких. Степень их выраженности определяется вариантом (лекарственно-чувствительный или лекарственно-устойчивый) и клинической формой (инфильтративный, диссеминированный, фиброзно-кавернозный) заболевания. Показана активация перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты в лимфоцитах и моноцитах при лекарственно-чувствительном туберкулезе и ее отсутствие при лекарственно-устойчивом варианте заболевания. Установлено, что изменения активности процессов перекисного окисления липидов, ферментативной антиоксидантной защиты, фосфолипидного спектра и микровязкостных свойств мембраны в мононуклеарах крови у больных туберкулезом легких и у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких носят однонаправленный характер, но более выражены в моноцитах при неспецифической инфекционной патологии легких. Обнаружено, что признаком мембранных нарушений, отличающим туберкулезную инфекцию, является повышенное содержание холестерина в плазматической мембране иммуноцитов. Получены новые данные, свидетельствующие о том, что нарушения липидного спектра мембраны мононуклеаров крови при лекарственно-чувствительном и устойчивом к терапии туберкулезе легких имеют место не только в период разгара клинической картины болезни, но и сохраняются после проведения противотуберкулезной химиотерапии. Мембранодеструктивное действие противотуберкулезных препаратов проявляется в большей степени после интенсивной фазы химиотерапии при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких. В его основе лежат интенсификация перекисного окисления липидов и увеличение содержания лизофосфолипидов в мембране мононуклеаров крови. При этом тенденция к нормализации липидного спектра, активности перекисного окисления липидов и ферментативных антиоксидантов в лимфоцитах и моноцитах крови на этапе завершения полного курса лечения больных туберкулезом легких наиболее выражена при диссеминированной форме инфекции.

Практическое и теоретическое значение работы. Новые знания фундаментального характера, касающиеся изменений микровязкостных свойств и липидного состава плазматической мембраны, а также активности процессов липопероксидации и ферментативного звена антиоксидантной защиты мононуклеарных лейкоцитов крови у больных туберкулезом легких раскрывают новые аспекты иммунопатогенеза туберкулезной инфекции. Результаты исследования могут служить основой для разработки новых способов коррекции метаболических и иммунологических нарушений, сопровождающих течение туберкулеза легких.

Положения, выносимые на защиту:

1. Течение лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких у лиц в возрасте 20-55 лет характеризуется структурной модификацией мембранных липидов в лимфоцитах и моноцитах крови, более выраженной при фиброзно-кавернозном лекарственно-устойчивом туберкулезе легких, в основе которой лежат однонаправленные изменения липидного спектра, уменьшение микровязкости анулярной и общей липидной фазы, нарушение белок-липидных контактов в плазматической мембране клеток.
2. Интенсивность перекисного окисления липидов, сопряженная с активацией супероксиддисмутазы, более высокая в моноцитах, чем в лимфоцитах крови, сопутствует манифестации лекарственно-чувствительного туберкулеза легких и не выявляется при лекарственно-резистентном варианте туберкулезной инфекции.
3. Биохимическим маркером туберкулеза легких, отличающим его от неспецифической инфекционной патологии легких (хроническая обструктивная болезнь легких в стадии обострения), является повышенное содержание холестерина в плазматической мембране мононуклеарных клеток крови.
4. Мембранодестабилизирующий эффект противотуберкулезной химиотерапии проявляется в большей степени на этапе интенсивного лечения при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких. Завершение курса поддерживающей терапии сопровождается тенденцией к нормализации показателей липидного спектра, перекисного окисления липидов и ферментативной антиоксидантной защиты иммуноцитов, более выраженной при диссеминированной форме лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких.

Реализация и апробация работы. Основные положения диссертации докладывались и обсуждались на Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию противотуберкулезной службы Томской области, 75-летию кафедры фтизиатрии и пульмонологии СибГМУ «Проблемы туберкулеза и современные пути их решения» (Томск, 2004), на Третьем Российском конгрессе по патофизиологии «Дизрегуляторная патология органов и систем» (Москва, 2004), Международной научной конференции «Медико-биологические и экологические проблемы здоровья человека на Севере» (Сургут, 2004), Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2005), Международном конгрессе «Иммунитет и болезни: от теории к терапии» (Москва, 2005), VI конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2005), IV Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых ученых и студентов по медицине (Тула, 2005), VII конгрессе молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 2006), XIII Российском научном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2006), научных семинарах кафедр патологической физиологии, фтизиатрии и пульмонологии ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава» (Томск, 2004-2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 22 работы, в том числе 12 статей в центральных журналах, рекомендованных ВАК РФ; 10 статей и тезисов в материалах конгрессов, конференций, съездов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 214 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4-х глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 14 рисунками и 17 таблицами. Библиографический указатель включает 338 источников, из них 235 отечественных и 103 зарубежных.

Работа выполнена на базе кафедр патофизиологии, фтизиатрии и пульмонологии и Центральной научно-исследовательской лаборатории ГОУ ВПО СибГМУ Росздрава г. Томска.

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты обследования 216 пациентов в возрасте 20-55 лет, страдающих распространенным деструктивным туберкулезом легких и проходивших лечение во фтизиатрических отделениях №1 (зав. отд. – О.И. Новосельцева), №2 (зав. отд. – Т.З. Малиновская) и №4 (зав. отд. – А.А. Янов) Томской областной клинической туберкулезной больницы (гл. врач – кандидат медицинских наук, Г.В. Янова). Амбулаторное наблюдение больных на завершающем этапе лечения осуществлялось на базе Томского областного противотуберкулезного диспансера (главный специалист – фтизиатр С.П. Мишустин). Пациенты поступали в Томскую областную клиническую туберкулезную больницу из учреждений поликлинической сети (МЛПМУ) г. Томска и Томской области.

Диагноз туберкулеза легких устанавливали на основании клинической картины заболевания, данных микроскопического и бактериологического исследования мокроты, рентгенологического исследования легких. Клиническую форму заболевания устанавливали на основании данных рентгенологического исследования легких.

Лечение больных туберкулезом легких проводилось в соответствии со стандартными схемами противотуберкулезной химиотерапии, включающими в себя интенсивную и поддерживающую фазы лечения. Длительность интенсивной фазы устанавливали индивидуально, независимо от лекарственной чувствительности возбудителя. Эффективность лечения оценивали с позиции прекращения бактериовыделения (по результатам бактериологического исследования мокроты), а также наличия положительной клинкорентгенологической динамики заболевания (улучшение клинического состояния пациента, рентгенологические признаки инволюции специфического процесса в легких). Длительность поддерживающей фазы химиотерапии в среднем составляла 4-7 месяцев при лекарственно-чувствительном и 10-12 месяцев при лекарственно-устойчивом варианте туберкулеза легких.

Все пациенты с туберкулезом легких были разделены на две основные обследуемые группы с учетом чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам: 135 больных лекарственно-чувствительным и 81 больной лекарственно-устойчивым вариантом туберкулезного процесса. Каждая группа дополнительно была разделена на подгруппы в зависимости от формы заболевания (инфильтративный, диссеминированный, фиброзно-кавернозный туберкулез легких) и периода химиотерапии (до начала терапевтических мероприятий, после интенсивной и поддерживающей фаз лечения).

Группы сравнения составили 18 здоровых мужчин и женщин в возрасте от 18 до 50 лет и 17 пациентов аналогичного пола и возраста с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Больные ХОБЛ в стадии обострения средней степени тяжести находились на амбулаторном лечении в МЛПМУ "Поликлиника №5" (главный врач – С.И. Коваленко), а также на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Томской городской больницы №3 (зав. отделением – И.В. Березко). Обострение ХОБЛ у всех пациентов носило инфекционно-зависимый характер с преобладанием общетоксических и бронхолегочных симптомов в клинической картине заболевания. Все лица, входящие в группу здоровых доноров прошли медицинский осмотр на базе МЛПМУ "Поликлиника №5". В анамне-

зе не было обнаружено хронических инфекционных заболеваний, аллергических реакций. Частота заболеваемости острыми респираторными вирусными и бактериальными инфекциями не превышала 2 раз в год.

Материалом исследования были лимфоциты и моноциты периферической крови, взятой утром натощак из локтевой вены, стабилизированной 5% раствором цитрата натрия.

Определение общего содержания лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в периферической крови проводили с использованием общепринятых гематологических методов.

Выделение лимфоцитов и моноцитов проводили на градиентах плотности фиколлюрографина ($1,077 \text{ г/см}^3$ и $1,083 \text{ г/см}^3$ соответственно) [Новиков А.К., Новикова В.И., 1979]. Концентрацию жизнеспособных клеток определяли в счетной камере Горяева с использованием 0,5% раствора трипанового синего [Гольдберг Е.Д. и соавт., 1992].

Оценку микровязкостных свойств плазматической мембраны мононуклеарных лейкоцитарных клеток крови осуществляли путем флуоресцентного зондирования с использованием флуоресцентного зонда пирен [Добрецов Г.Е., 1989].

Выделение плазматических мембран мононуклеарных лейкоцитов проводили путем разделения клеточных компартментов в двухфазной системе декстран (500 000)-ПЭГ 6000 [Финдлей Дж., Эванс С., 1991].

Изучение липидного спектра мембран мононуклеарных лейкоцитов периферической крови осуществляли поэтапно с использованием метода тонкослойной хроматографии: выделение липидного экстракта [Folch J. et al., 1957]; определение содержания общих фосфолипидов [Колб В.Г., 1982]; разделение основных классов фосфолипидов и нейтральных липидов [Жухоров Л.С., 1984]; определение процентного содержания фракций липидов; количественное определение фосфолипидов [Жухоров Л.С., 1984]; количественное определение холестерина [Карпищенко А.И., 2002]. Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием соответствующих стандартов фирмы «Sigma» (США).

Исследование содержания ТБК-активных продуктов [Арутян А.В. и соавт., 2000] и диеновых конъюгатов [Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И., 1983] в мононуклеарах периферической крови проводили методом спектральной фотометрии.

Активность супероксиддисмутазы (аденохромовый метод) и каталазы (по убыли перекиси водорода) в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови определяли спектрофотометрически [Арутян А.В. и соавт., 2000].

Полученные в ходе исследования данные обрабатывали с использованием стандартного пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.». При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся закону нормального распределения, использовали критерий Манна-Уитни (несвязанные выборки). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили путем вычисления r-коэффициента Спирмена и корреляционного отношения [Лакин А.В., 1980].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Важную роль в развитии отрицательного патоморфоза туберкулезной инфекции играет изменяющаяся в современных социально-экономических и экологических условиях реактивность организма, определяющая в конечном итоге его ответную реакцию на внедре-

ние и последующее размножение микобактерий туберкулеза [Каминская Г.О, Абдуллаев Р.Ю., 2004].

Дизрегуляция иммунных процессов при туберкулезе во многом определяется нарушениями структурно-метаболического и функционального статуса иммунокомпетентных клеток – лимфоцитов и моноцитов [Хонина Н.А. и соавт., 2000; Flynn J.L., Ernst J.D., 2000; Кноринг Б.Е. и соавт., 2001; Салина Т.Ю., Худзик Л.Б., 2001; Сахарова И.Я. и соавт., 2003; Чучалин А.Г., 2004]. Изменения со стороны системы крови, а также механизмы, лежащие в их основе, по большому счету носят однотипный характер и являются неспецифическими для различных инфекционных процессов, в том числе и при бронхолегочных заболеваниях [Карпова М.Р. 1999; Гольдберг Е.Д. и соавт., 2001]. Однако индивидуальные патогенные свойства микроорганизма могут влиять на особенности реагирования клеток крови и иммунной системы в целом [Карпова М.Р., 1999]. Известно, что большинство бронхолегочных заболеваний, в том числе и туберкулез легких, сопровождаются рядом основных клинических симптомов, среди которых превалируют синдром воспалительной интоксикации и бронхолегочные симптомы. В связи с этим, установление специфики изменений, характерных для туберкулезного процесса, является необходимым условием для более детального изучения данной патологии.

С этих позиций нами была проведена оценка свойств липидной фазы мембраны, активности перекисного окисления липидов и ферментов антиоксидантной защиты у больных туберкулезом легких (ТЛ) и у пациентов с ХОБЛ.

Нормальное функционирование мембраны лимфоцитов и моноцитов, основных эффекторных клеток, участвующих в противотуберкулезном иммунитете, во многом определяется ее микровязкостными свойствами, зависящими, главным образом, от состояния липидного бислоя [Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е., 1980, Болдырев А.А., 1990, Gudi S.R.P., 1990; Геннис, 1997; Wustner D. et al., 1998; Kamp D., 2001]. Поддержание микровязкости на оптимальном уровне является неременным условием для осуществления латеральной диффузии белковых и липидных молекул, трансмембранного флип-флоп-переноса липидов [Конев С.В., 1987; Catania A., 1992; Dumas D., 1997; Corver J, 2000]. Среди факторов, определяющих текучесть мембраны, наиболее важными являются вид и концентрация отдельных липидов, подвижность углеродных атомов в углеводородной цепи, длина углеводородных цепей фосфолипидов, степень насыщенности жирных кислот [Артюхов В.Г., Наквасина М.А., 2000; Kilfer C.R., 2000]. Модификация микровязкостных свойств липидной компоненты мембраны закономерно приводит к утрате способности клеток регулировать свой ионный и антиоксидантный гомеостаз, нарушению их вязкоэластических свойств, работы мембраносвязанных энзимов, связыванию рецепторов с вторичными мессенджерами и лигандами, что в конечном итоге способствует изменению метаболизма в клетке, а также приводит к необратимым нарушениям ее структурно-функционального статуса [Болдырев А.А., 1986; Wustner D. et al., 1998; Антонов В.Ф., 1996; Kamp D., 2001].

В аспекте этого нами была проведена оценка микровязкостных свойств плазматической мембраны лимфоцитов и моноцитов у больных туберкулезом легких до начала противотуберкулезной химиотерапии и у пациентов с ХОБЛ в фазу обострения с использованием метода флуоресцентного зондирования.

В результате исследований получены фактические данные, подтверждающие наличие выраженных изменений вязкости липидного бислоя мембраны лимфоцитов и моноцитов у больных ТЛ и у пациентов, страдающих ХОБЛ (рис. 1). Так, у больных ТЛ до лечения (как и у пациентов с ХОБЛ) было выявлено достоверное (относительно аналогичных показателей у здоровых доноров) увеличение ($p < 0,001$) коэффициентов эксимеризации пирена

I_{470}/I_{370} и I_{470}/I_{390} при длинах волн возбуждающего света (λ) 285 нм и 340 нм независимо от вида иммунокомпетентных клеток, клинической формы заболевания и лекарственной устойчивости возбудителя инфекции. При этом наибольшие изменения в показателях флуоресценции отмечались при фиброзно-кавернозной форме лекарственно-устойчивого ТЛ, характеризующейся наибольшими деструктивными нарушениями в легких. Полученные данные свидетельствуют о снижении микровязкости и/или увеличении гидрофобного объема как в зоне белок-липидных контактов, оцениваемой при длине волны возбуждающего света 285 нм, так и в общем липидном бислое ($\lambda=340$ нм), что может быть связано с модификацией фосфолипидного спектра в мембране в сторону увеличения пула легко-окисляемых фракций липидов, характеризующихся высоким содержанием ненасыщенных жирнокислотных остатков [Добрецов Г.Е., 1980; Дунаева А.Н. и соавт., 1990; Кузьмичева Л.В. и соавт., 2005]. Выявленные в иммунocyтaх у больных во всех сравниваемых группах наблюдения достоверно низкие ($p<0,001$) значения процента индуктивно-резонансного переноса энергии с триптофана на пирен можно объяснить увеличением текучести мембраны в зоне белок-липидных контактов и снижением полярности окружения молекул пирена [Горошинская И.А. и соавт., 1999; Евдокимов С.А., 2002].

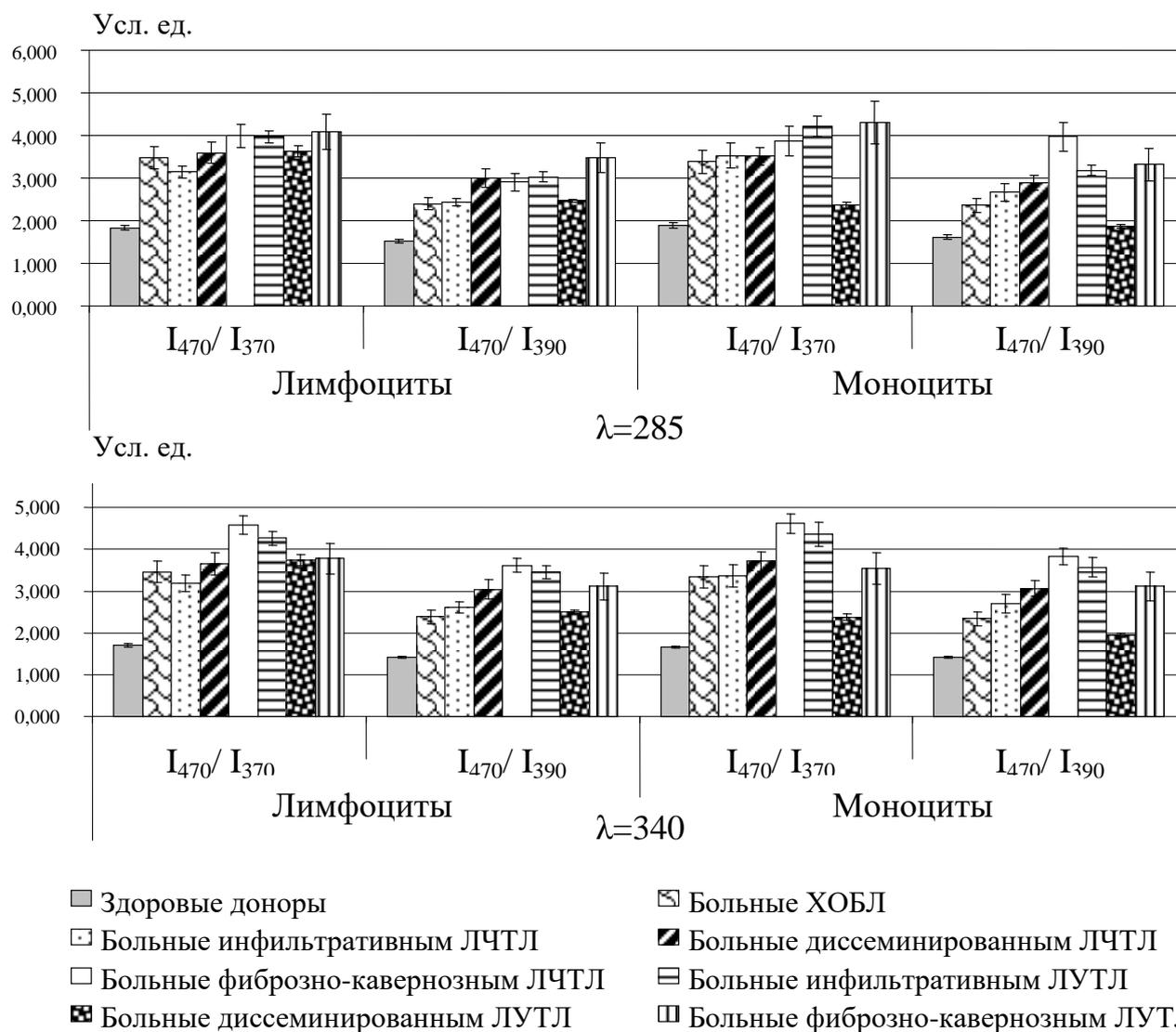


Рис. 1. Величина эксимеризации пирена в плазматической мембране мононуклеаров крови у здоровых доноров, больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), лекарственно-чувствительным (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым (ЛУТЛ) туберкулезом легких до лечения.

Изменения параметров флуоресценции как в лимфоцитарной, так и в моноцитарной мембране позволяют предположить общий характер нарушений, а достаточно похожая картина изменений показателей флуоресценции пирена в мембране лейкоцитов при ТЛ и ХОБЛ указывает на их типовой характер.

Непосредственное участие липидных компонентов в процессах клеточной активации, продукции медиаторов иммунного ответа, регуляции фагоцитоза и цитотоксических реакций определяет важное значение гомеостаза липидного состава плазматической мембраны в стабилизации и полноценности иммунных реакций организма [Кузьмичева Л.В. и соавт., 2005; Убайдуллаев С.А. и соавт., 2005; Вязова А.В., 2006].

С этих позиций нами было проведено исследование липидного спектра плазматической мембраны моноцитов и лимфоцитов у больных ТЛ и ХОБЛ. В частности, у больных ТЛ до начала терапевтических мероприятий были показаны изменения абсолютного и процентного соотношения отдельных фракций фосфолипидов на фоне нормального содержания их суммарного уровня, которые выражались в снижении количества сфингомиелина (СФМ), фосфатидилхолина (ФХ) и повышении содержания фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в плазматической мембране мононуклеаров крови независимо от клинической формы заболевания и чувствительности возбудителя к действию противотуберкулезных химиопрепаратов, наиболее выраженные при фиброзно-кавернозном ЛУТЛ относительно аналогичных показателей у здоровых доноров (рис. 2). Интересен факт наличия различных по величине, но однонаправленных изменений фосфолипидного состава мембраны у больных ТЛ и ХОБЛ, что может свидетельствовать об общем механизме нарушений со стороны фосфолипидов как при специфическом патологическом процессе (ТЛ), вызванном микобактериальной инвазией, так и при неспецифическом воспалении в легких (ХОБЛ).

Учитывая значимое снижение содержания ФХ и увеличение концентрации ФЭА на фоне нормального уровня ФС у больных ТЛ и ХОБЛ, можно предположить, что изменения, влекущие за собой данный сдвиг в отношении ФХ и ФЭА, связаны с нарушениями на этапе метилирования ФЭА S-аденозилметионином, следствием чего является более низкий уровень ФХ и высокая концентрация ФЭА. Не исключено снижение уровня ФХ также за счет дефицита его предшественника – холина [Кагава Я., 1985; Геннис Р., 1997]. Сниженная концентрация СФМ, очевидно, связана с низким уровнем ФХ – основного предшественника синтеза данного сфинголипида. При этом снижение содержания СФМ, скорее всего, не зависит от резкого увеличения активности сфингомиелиназы, на активность которой влияет ряд факторов: фосфатидная кислота, образующаяся при разрушении ФХ под действием фосфолипазы D; арахидоновая кислота, образующаяся при разрушении ФХ под действием фосфолипазы A₂; связывание фактора некроза α (ФНО- α) с рецепторами ФНО- α и последующей активацией сфингомиелиназы и др. Отсутствие достоверных изменений со стороны фракции лизофосфолипидов (ЛФЛ) в мембране мононуклеарных клеток у больных ТЛ и ХОБЛ позволяет предположить если не нормальный, то, по крайней мере, незначительно повышенный уровень активности фосфолипазы A₂. В качестве одного из механизмов иммунопатологических изменений при ТЛ и ХОБЛ рассматривается также недостаточность секреции провоспалительных цитокинов (в том числе ФНО- α) клетками моноцитарно-макрофагального происхождения и снижение функциональной активности В-лимфоцитов, что, видимо, также не приводит к активации сфингомиелиназы [Покровский В.И. и соавт., 1994; Красильников А.П., Романовская Т.Р., 1999]. Увеличенное содержание фракции ФИ в мембране мононуклеаров крови у больных ТЛ, равно как и у пациентов с ХОБЛ, видимо, также является следствием адаптационно-компенсаторной реакции,

направленной на сохранение пула предшественников вторичных мессенджеров, участвующих в передаче сигнала. Однако более высокая (относительно нормальных значений) концентрация ФИ может быть связана также с нарушением синтеза фосфатидилинозит-4,5-дифосфата, являющегося субстратом для фосфолипазы С, снижение активности которой также способно влиять на исходный уровень фосфатидилинозитолов.

В мембране клеток, помимо фосфолипидов, присутствует холестерин – один из важнейших регуляторов «жесткости» липидной фазы. В связи с тем, что холестерин является важным структурным компонентом плазматических мембран, изменение его концентрации безусловно чревато изменением микровязкости бислоя, латеральной диффузии рецепторов, нарушением ионного транспорта, что делает мембрану иммунокомпетентных клеток крови менее приспособленной к выполнению своих функций [Lijnem P. et al., 1990; Момыналиев К.Т. и соавт., 1996; Dumas D. et al., 1997; Новицкий В. В. и соавт., 2004]. С другой стороны, увеличение содержания холестерина в мембранах стабилизирует липидный бислой и ограничивает проницаемость мембран для Ca^{2+} [Владимиров Ю.А., 1989; Ройт А., 2000; Catfield J., 2000; Graziani A. et al., 2006]. Однако при избыточном накоплении холестерина микровязкость липидного бислоя клеточных мембран постепенно ухудшается, что отрицательно сказывается на функциональных свойствах Na^+ , K^+ - и Ca^{2+} -АТФ-азы [Lijnem P. et al., 1990]. Холестерин проявляет определенное сродство к отдельным фосфолипидам [Геннис Р., 1997]. Существует предположение о наличии стабильных молекулярных комплексов «фосфолипид/холестерин» [Артюхов В.Г., Наквасина М.А., 2000].

Эфиры холестерина (ЭХС) являются более гидрофобными молекулами, образуясь в процессе этерификации гидроксильной группы ХС. Являясь транспортной формой ХС, его эфиры участвуют в процессах выведения избытка неэтерифицированных жирных кислот. Повышение их уровня существенно увеличивает проницаемость клеточной мембраны для одновалентных ионов и тем самым способствует снижению осмотической стойкости клеток [Жухоров Л.С., Голованов С.А., 1984]. Кроме того, образованные в клетке эфиры холестерина становятся депонированной формой полиеновых жирных кислот как субстрата для синтеза биологически активных метаболитов, таких как простаноиды [Титов В.Н., 1997].

По данным, полученным в ходе настоящего исследования, в период обострения ХОБЛ было выявлено снижение как абсолютного, так и процентного содержания ХС и ХС/ФЛ-отношения в мембране мононуклеарных лейкоцитов (рис. 3). Значительное снижение фракции ХС можно объяснить усилением процессов этерификации, влекущих за собой повышенное образование ЭХС, а также повышением текучести мембраны клеток вследствие увеличения пула фосфолипидов с ненасыщенными остатками жирных кислот в своем составе, что может отразиться на полноценности развития иммунного ответа.

Нами установлено, что в отличие от больных ХОБЛ, у пациентов с ТЛ до начала лечения вне связи с клинической формой заболевания и чувствительностью возбудителя инфекции к действию противотуберкулезных препаратов в мембране клеток отмечалось четкое повышение процентного содержания ХС и снижение концентрации ЖК (рис. 3). Наряду с этим, лекарственно-устойчивый вариант ТЛ сопровождался дополнительным снижением уровня ЭХС. Однако абсолютное содержание ХС и ХС/ФЛ-отношение в мембране мононуклеарных лейкоцитов при ЛЧТЛ находилось в пределах нормы и возрастало при ЛУТЛ.

Как отмечалось ранее, увеличение содержания ХС в мембране обычно приводит к увеличению ее «жесткости», что, на первый взгляд, не согласуется с данными, полученными в ходе исследования микровязкостных свойств мембраны иммуноцитов липотропным зондом пирен и характеристиками фосфолипидного спектра. Детальный подход к рас-

смотрению подобного рода «несогласованности» позволяет предположить, что в мембране мононуклеаров крови происходит не столько увеличение, сколько перераспределение ХС с образованием холестерин-насыщенных и холестерин-истощенных участков липидного бислоя.

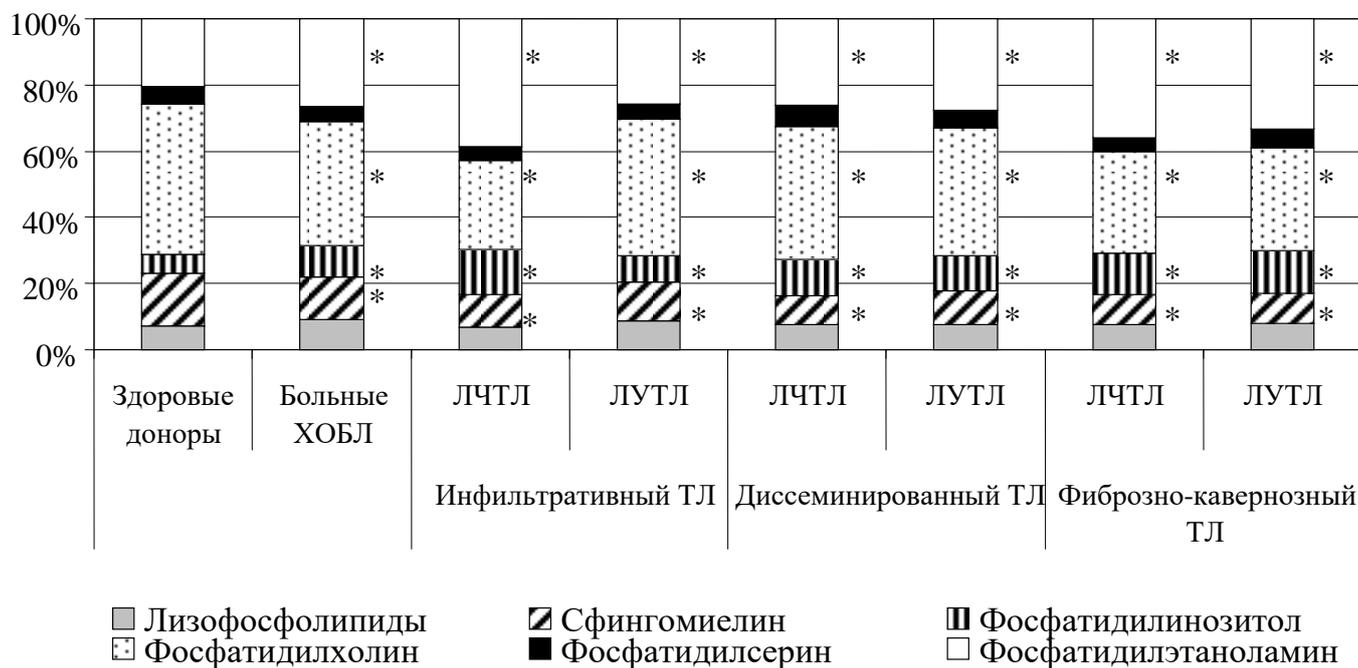


Рис. 2. Процентное соотношение отдельных фракций фосфолипидов в плазматической мембране мононуклеаров крови у здоровых доноров, больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), лекарственно-чувствительным (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым (ЛУТЛ) туберкулезом легких до лечения. * - Статистически значимые различия по сравнению с показателями у здоровых доноров.

На данный момент установлено, что ХС, образуя определённого рода кластеры в комплексе с гликопротеинами, специфически активизирует поглощение микобактерий макрофагами, и в мембране, лишенной большей части холестериновой фракции, фагоцитоз является несостоятельным. При этом свободный ХС оказывает опосредованное влияние на фагосомальную сборку покрывающего триптофан-аспарагин-содержащего белка (ТАСО), который предотвращает деградацию МБТ в фаголизосомах [Catfield Jh., 2000]. Очевидно, что входящие в макрофаги через обогащённые холестерином мембранные домены клеток-хозяина МБТ могут обеспечить себе последующую выживаемость в насыщенных ХС и покрытых ТАСО фагосомах. Высокий процент ХС в мембране фагосомы, образующейся в процессе фагоцитоза, вероятно, является не только дополнительным защитным «панцирем» для находящихся внутри МБТ, но и, возможно, еще одной причиной, препятствующей слиянию фагосомы с лизосомой. Следовательно, достаточно высокий уровень свободного ХС в мембране моноцитов/макрофагов – основное условие для «благополучного» их инфицирования микобактериями. Кроме того, показано «флюидизирующее» действие этанола на плазматическую мембрану лимфоцитов [Сторожок С.А. и соавт., 2001; Макаров В.К., 2006]. Учитывая факт наличия синдрома алкогольной зависимости почти у половины обследованных пациентов с ТЛ, можно рассматривать увеличение уровня холестерина в плазматической мембране как один из адаптационных механизмов, повышающих толерантность мембраны к действию алкоголя.

Снижение процентной величины свободных ЖК и ЭХФ в мембране иммунокомпетентных клеток при ТЛ, вероятнее всего, является результатом увеличения процента холестериновой фракции. Однако это может быть связано с повышенной потребностью в синтезе эйкозаноидов, увеличение содержания которых показано при туберкулезном процессе [Каминская Г.О., 1996]. Более высокий уровень ХС в мембране иммуноцитов при ЛУТЛ, вероятно, определяется спецификой лекарственно-устойчивых штаммов МБТ, обладающих высоким полиморфизмом и для проникновения которых в клетку-хозяина необходим более насыщенный холестерином домен с последующей «гарантией» на выживание инфекта.

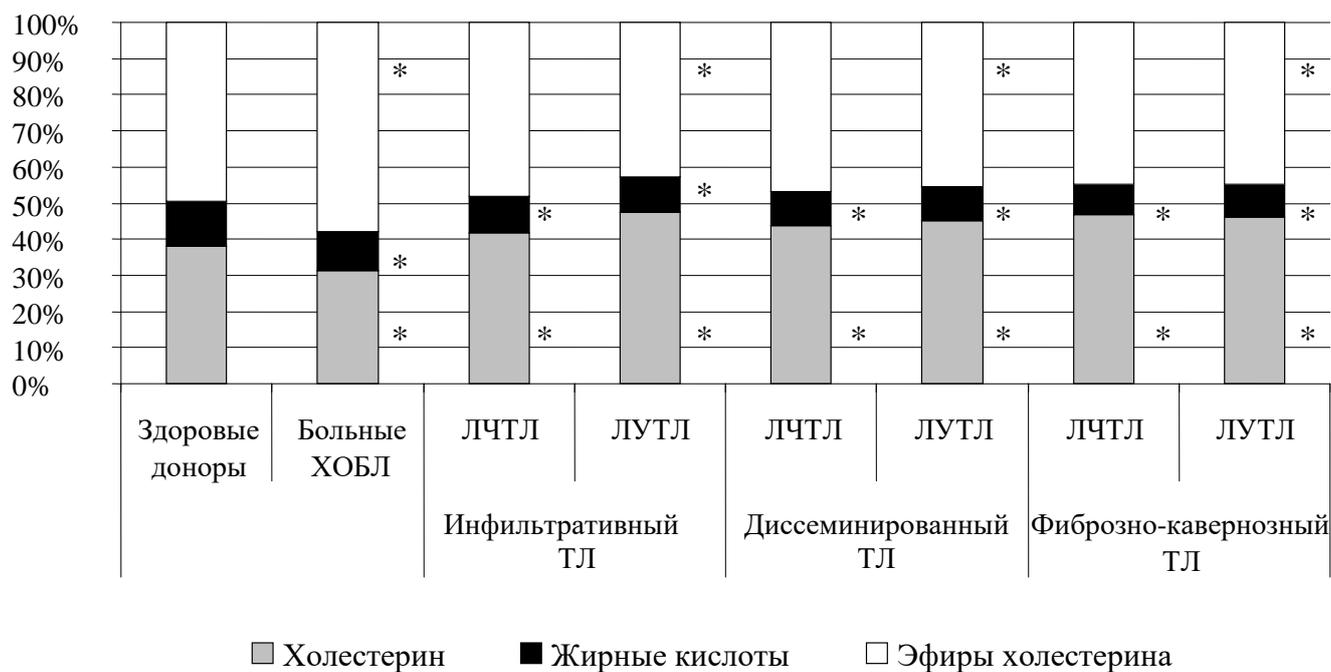


Рис. 3. Процентное соотношение фракций холестерина, эфиров холестерина и жирных кислот в плазматической мембране мононуклеаров крови у здоровых доноров, больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), лекарственно-чувствительным (ЛЧТЛ) и лекарственно-устойчивым (ЛУТЛ) туберкулезом легких до лечения. * - Статистически значимые различия по сравнению с показателями у здоровых доноров.

Одним из универсальных механизмов, вызывающих структурную перестройку биологических мембран, является интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), результатом которых может быть увеличение микровязкости липидного бислоя [Владимиров Ю.А., 1989; 1998; 2000].

У пациентов с ХОБЛ как в лимфоцитах, так и в моноцитах крови было выявлено существенное увеличение (относительно показателей у здоровых доноров, $p < 0,01$) концентрации ТБК-активных продуктов (ТБК-а) и диеновых конъюгатов (ДК). Наряду с этим, отмечалась повышенная ($p < 0,01$) активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД, $p < 0,01$) независимо от специализации иммунокомпетентных клеток.

Повышенная активность процессов ПОЛ у больных с лекарственно-чувствительным ТЛ на начальном этапе исследования регистрировалась нами при всех его клинических формах и характеризовалась более высоким (относительно контроля) уровнем ТБК-а, наиболее выраженным в моноцитах, а также значимо высоким содержанием ДК в моноцитарных клетках при инфильтративной и фиброзно-кавернозной формах ТЛ. При этом активность каталазы не отличалась от таковой у здоровых доноров, а активность СОД превышала нормальные показатели независимо от клинической формы заболевания и специа-

лизации клеток. При лекарственно-устойчивом варианте ТЛ изменений в изучаемых параметрах по сравнению с данными в группе здоровых доноров выявлено не было. Исключение составила повышенная активность каталазы и СОД в лимфоцитах при диссеминированной форме ЛУТЛ (табл. 1, 2). Вместе с тем, у пациентов с ЛУТЛ регистрировался более низкий уровень ТБК-реактивных продуктов и снижение активности антиоксидантных ферментов в лимфоцитах и моноцитах периферической крови по сравнению с указанными показателями при хроническом неспецифическом воспалительном процессе в легких. Лекарственно-чувствительный тип ТЛ сопровождался достоверно сниженной активностью СОД в моноцитах, а также каталазы в моноцитах и лимфоцитах относительно таковых при ХОБЛ. В целом данные изменения свидетельствуют о том, что при ТЛ интенсивность ПОЛ и сопряженная с ним активация ферментов антиоксидантной защиты менее выражены, чем при ХОБЛ.

Активация процессов липопероксидации при ЛЧТЛ в первую очередь может свидетельствовать о развитии иммунного ответа на вторжение инфекта и попытке «уничтожить» возбудителя в пределах системы «макрофаг/цитотоксический лимфоцит». Большая выраженность процессов ПОЛ в моноцитах, нежели в лимфоцитах – очередное свидетельство важности моноцитов/макрофагов как первичного защитного звена в противотуберкулезном иммунитете, которым принадлежит ведущая роль в исходе возникающего конфликта при внедрении в организм МБТ [Каминская Г.О. и соавт., 2001; 2006; Титов В.Н., 2003]. Интенсификация ПОЛ в фагоцитирующих клетках (макрофагах, нейтрофилах) неизбежно влечет за собой активацию ПОЛ в организме, что отражается в увеличении липопероксидации в лимфоцитах, эритроцитах и других клетках [Араблинская Н.Е. и соавт., 2006; Каминская Г.О. и соавт., 2006]. Следовательно, инфицирование лекарственно-чувствительными штаммами микобактерий не уходит от надзора иммунной системы, чего нельзя сказать про лекарственно-устойчивые микобактериальные штаммы. Отсутствие значимых изменений в уровне исследуемых продуктов ПОЛ при ЛУТЛ (рис. 4), по-видимому, еще одно доказательство способности устойчивых к действию химиопрепаратов МБТ, обладающих эффективными механизмами ингибирования АФК, «ускользнуть» от иммунного надзора [Маянский А.Н., 2001; Краснов В.А. и соавт., 2005].

Увеличение активности СОД в иммуноцитах при ТЛ, скорее всего, как и при ХОБЛ, является адаптивно-компенсаторной реакцией, направленной на удаление избытка супероксид-аниона, обладающего способностью вызывать цепную реакцию радикального окисления липидов не только возбудителя инфекции, но и собственных липидных комплексов и мембранных липидов в частности [Каминская, Г.О., Абдуллаев Р.Ю., 2004; Краснов В.А. и соавт., 2005; Каминская и соавт., 2006]. На адаптивный характер подобной стимуляции СОД может указывать выявленная нами положительная корреляция между активностью СОД и уровнем ТБК-а при инфильтративном ЛЧТЛ в моноцитах ($r=0,77$; $p<0,05$) и лимфоцитах ($r=0,84$; $p<0,05$). По данным Г.О. Каминской [2006], активность СОД находится в обратной зависимости со степенью лекарственной устойчивости возбудителя ТЛ, обладая максимумом активности при лекарственно-чувствительном и монорезистентном ТЛ. Скорее всего, данный факт также влияет на неизменную активность СОД при ЛУТЛ. Отсутствие видимых изменений каталазной активности в иммуноцитах крови при ТЛ до начала лечения можно объяснить вероятным усилением активности глутатионзависимых ферментов, являющихся более эффективными «утилизаторами» липоперексидов, образующихся в процессе ПОЛ [Артюхов В.Г., Наквасина М.А., 2000].

Данные, полученные в ходе исследования ПОЛ и ферментов антиоксидантной системы моноцитов и лимфоцитов у больных ЛУТЛ до лечения, согласуются с результатами

флуоресцентного зондирования и показателями липидного спектра мембраны иммуноцитов (рис. 4). Однако при ЛЧТЛ, равно как и при ХОБЛ, несмотря на повышенное содержание конечных продуктов липопероксидации, способствующих снижению текучести мембраны вследствие снижения ее гидрофобного объема, регистрируется сниженная микровязкость мембранных липидов. Вероятно, это можно связать, во-первых, с увеличением антиоксидантной активности СОД, хотя, по всей видимости, недостаточным, чтобы предотвратить активацию ПОЛ на начальном ее этапе [Кольман Я., Рем К.-Г., 2000]. Во-вторых, это может быть проявлением адаптационной реакции, направленной на стабильно повышенную наработку пула фосфолипидов, содержащих остатки ненасыщенных жирных кислот, являющихся субстратом для ПОЛ [Кузьмичева Л.В. и соавт., 2005; Вязова А.В., 2006]. В-третьих, удаление гидроперекисей ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов мембраны, происходит, по видимому, в результате комбинированного действия фермента фосфолипазы А₂, отщепляющей остаток окисленной жирной кислоты от фосфолипида (благодаря чему он выходит из липидного слоя мембраны в окружающую водную среду), и глутатионпероксидазы, которая восстанавливает гидроперекись до спирта за счет окисления глутатиона [Владимиров Ю.А., 1998; Артюхов В.Г., Наквасина М.А., 2000]. Активный обмен окисленных форм мембранных фосфолипидов, содержащих гидрофильные углеводородные «хвосты» и вытесненных из толщи мембраны к ее поверхности с плазменными липопротеинами – вероятно, еще один фактор, объясняющий повышенную флуоресценцию пирена и текучесть мембраны клеток [Лисица А.В. и соавт., 2006]. Нельзя исключить, что увеличение продуктов ПОЛ – результат повреждения в большей степени внутриклеточных липидсодержащих структур (к примеру, митохондрий), и в меньшей – плазматической мембраны клеток.

Таблица 1

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты в лимфоцитах крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких до лечения, Me (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		Лимфоциты			
		ТБК-а, мкмоль/мг белка	ДК, мкмоль/мг белка	Каталаза, мкат/мг белка	СОД, усл.ед./мг белка
Здоровые доноры		1,80 (1,58-2,36)	1,86 (1,64-2,45)	2,04 (1,80-2,68)	0,60 (0,53-0,79)
ЛЧТЛ	Инфильтративный	2,66 (2,17-3,46)	2,27 (1,81-2,66)	2,27 (2,10-2,49)	1,20 (0,98-1,33)
	Диссеминированный	2,46 (2,17-2,56)	1,81 (1,77-1,98)	1,87 (1,73-2,10)	1,06 (0,98-1,19)
	Фиброзно-кавернозный	2,40 (1,96-3,29)	1,96 (1,73-2,49)	2,23 (2,19-2,34)	1,16 (1,04-1,08)
ЛУТЛ	Инфильтративный	1,90 (1,78-1,98)	1,96 (1,58-2,06)	2,00 (1,83-2,29)	0,66 (0,61-0,70)
	Диссеминированный	1,89 (1,74-2,69)	1,98 (1,94-2,45)	3,31 (2,77-4,60)	1,57 (0,89-2,61)
	Фиброзно-кавернозный	1,95 (1,88-2,19)	2,02 (1,94-2,25)	2,21 (2,04-2,31)	0,66 (0,63-0,74)

Примечание. Здесь и в табл. 2: ТБК-а – ТБК-активные продукты; ДК – диеновые конъюгаты; СОД – супероксиддисмутаза, ЛЧТЛ и ЛУТЛ – лекарственно-чувствительный и лекарственно-устойчивый туберкулез легких.

Специфическая химиотерапия занимает ведущее значение среди устоявшихся методов лечения туберкулеза [Мишин В.Ю., Степанян И.Э., 2000; Карачунский М.А., 2001]. Однако терапия как ЛЧТЛ, так и ЛУТЛ одинаково опасна в плане повреждающего воздействия химиопрепаратов на различные органы и системы больного [Голиков С. Н., 1986; Перельман М.И., 1990]. Среди общих механизмов токсического действия различных веществ изменения внутриклеточного метаболизма, структуры и функции мембраны клеток рассматриваются как ведущие и, вероятнее всего, первичные факторы в патогенезе клинических проявлений побочных реакций ПТП [Голиков С.Н., 1986].

После интенсивного курса химиотерапии нами было зарегистрировано изменение флуоресценции мембраны (относительно изучаемых параметров на долечebном этапе) при диссеминированном ЛЧТЛ, выражающееся значимым снижением коэффициентов эксимеризации пирена как в анулярной липидной фракции ($\lambda=285$ нм), так и в общем липидном бислое ($\lambda=340$ нм), что косвенно указывает на снижение текучести липидной фазы. При этом существенных изменений показателей флуоресценции в мембране иммуноцитов при инфильтративном и фиброзно-кавернозном ЛЧТЛ по сравнению с показателями до лечения нами выявлено не было. Тенденция к нормализации изучаемых параметров флуоресценции была зарегистрирована также у пациентов с ЛУТЛ, и прежде всего при диссеминированной его форме.

Таблица 2

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов антиоксидантной защиты в моноцитах крови у здоровых доноров и больных туберкулезом легких до лечения, Me (Q1-Q3)

Группы обследованных лиц		Моноциты			
		ТБК-а, мкмоль/мг белка	ДК, мкмоль/мг белка	Каталаза, мкат/мг белка	СОД, усл.ед./мг белка
Здоровые доноры		1,67 (1,47-2,19)	1,95 (1,72-2,56)	2,15 (1,89-2,82)	0,47 (0,42-0,62)
ЛЧТЛ	Инфильтративный	3,22 (2,98-3,87)	2,77 (2,26-3,05)	2,55 (2,08-2,81)	0,80 (0,62-0,91)
	Диссеминированный	3,87 (2,98-4,02)	2,44 (2,26-2,74)	2,24 (2,08-2,52)	4,17 (3,87-4,68)
	Фиброзно-кавернозный	2,92 (2,33-3,04)	2,93 (2,76-3,06)	2,68 (2,45-2,80)	0,79 (0,71-1,01)
ЛУТЛ	Инфильтративный	1,99 (1,51-2,09)	2,04 (1,77-2,73)	2,29 (2,02-2,47)	0,46 (0,28-0,72)
	Диссеминированный	1,86 (1,76-2,19)	2,07 (1,94-2,96)	2,68 (2,20-3,09)	0,53 (0,33-0,62)
	Фиброзно-кавернозный	1,88 (1,74-2,04)	2,11 (2,04-2,34)	2,33 (2,24-2,63)	0,51 (0,47-0,53)

Известно, что снижение флуоресценции мембранного зонда пирен может быть следствием перераспределения мембранных липидов с увеличением доли фосфолипидных фракций, содержащих в своем составе более насыщенные ЖК, а также ХС, регулирующих мембранную «жесткость». Кроме того, тушение флуоресценции пирена может быть связано с накоплением продуктов липопероксидации или снижением уровня антиоксидантов, ответственных за поддержание мембраны в «текущем состоянии» [Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е., 1980].

После завершения интенсивной фазы лечения фосфолипидный состав мембраны мононуклеаров крови у больных как ЛЧТЛ, так и ЛУТЛ характеризовался наличием похожих

изменений (относительно нормальных величин), зарегистрированных до начала лечения. Среди них: снижение абсолютного и процентного количества СФМ, ФХ и повышение содержания ФИ и ФЭА. Уровень ФС на втором этапе обследования по-прежнему не отличался от нормы, за исключением пациентов с фиброзно-кавернозной формой ЛУТЛ, у которой отмечалось его увеличение ($p_1 < 0,05$) относительно контрольных значений. Наряду с этим, было выявлено повышенное (как абсолютное, так и относительное) содержание ЛФЛ в мембране иммуноцитов крови у больных ЛУТЛ вне зависимости от клинической формы заболевания и в группе пациентов с диссеминированным ЛЧТЛ по сравнению с таковым в группе здоровых доноров. Устанавливался значительно повышенный ($p_1 < 0,01$) уровень суммарных фосфолипидов при фиброзно-кавернозном ЛЧТЛ. Процентное содержание жирных кислот в мембране мононуклеарных клеток после интенсивной фазы у больных всех обследуемых групп оставалось ниже нормальных величин.

Повышенное количество ХС (%) регистрировалось только при лекарственно-устойчивом варианте туберкулезного процесса и нормализовалось при ЛЧТЛ. Абсолютное содержание фракции ХС оставалось выше контрольного уровня не только при ЛУТЛ, но и при инфильтративном лекарственно-чувствительном типе туберкулезного процесса в легких. Вместе с тем, содержание ЭХС (%) в мембране клеток после интенсивного курса химиотерапии не отличалось от контрольных значений у обследованных больных ТЛ.

Отсутствие существенных изменений в показателях флуоресценции при инфильтративном и фиброзно-кавернозном ЛЧТЛ, видимо, напрямую связано с отсутствием изменений в фосфолипидном спектре мембраны. Снижение процентного содержания ХС в мембране при фиброзно-кавернозном ЛЧТЛ, закономерно приводящее к нормализации сниженного ранее процентного уровня ЭХС, могло быть обусловлено выявленным нами увеличением объема суммарных фосфолипидов, связанного, вероятно, с усилением пассивного транспорта полиеновых ЖК в клетки путем обмена с «неполноценными» вследствие химиотерапии ЛПВП, содержащих большое количество фосфолипидов с ненасыщенными ЖК [Титов В.Н., 1997; Лизенко М.В. и соавт., 2004]. Подобные механизмы, возможно, характерны для инфильтративной и диссеминированной форм ЛЧТЛ. Хотя увеличения пула суммарных фосфолипидов при данных формах туберкулеза нами не было выявлено, можно предположить, что они играют роль в поддержании патологически измененного фосфолипидного состава. Кроме того, может нарушаться еще одна важная функция ЛПВП, так называемый обратный транспорт ХС, снятие его с клеточных мембран и доставка в печень, зависящая от стабильности частиц, которая, в свою очередь, обеспечивается липидным составом комплекса [Лизенко М.В. и соавт., 2004; Goldiner I. et al., 2006]. Неполноценность количественного состава фосфолипидов, а точнее резкое снижение уровня ФХ, приводит к нестабильности ЛПВП. Вероятно, с этим связано увеличение абсолютного содержания ХС при инфильтративном ЛЧТЛ.

Возрастание концентрации ЛФЛ могло быть связано с увеличением активности фосфолипазы А₂ при интенсификации ПОЛ, а также за счет активации других метаболических путей, которые приводят к синтезу и накоплению ЛФЛ, в частности под действием лецитин-холестерин-ацетилтрансферазы при переносе жирнокислотного остатка с ФХ на холестерин и благодаря окислительным процессам при активации собственной фосфолипазой А₂-активности апоВ-апоБелка. Потенциальным механизмом повышенного образования лизоформ фосфолипидов может являться также снижение активности лизофосфолипазы.

Стабильность количественных нарушений со стороны других фосфолипидных фракций, выявленных нами еще до начала лечения, у больных ЛУТЛ и диссеминированным ЛЧТЛ после интенсивной фазы, вероятно, поддерживается путем взаимодействия мембра-

ны клеток с липопротеинами, содержащими патологически измененный набор фосфолипидов [Титов В.Н., 1997]. Кроме того, несмотря на все еще высокий уровень ХС и ХС/ФЛ-отношения в мембране иммуноцитов, у больных ЛУТЛ после курса интенсивной терапии регистрировалось снижение процентного содержания свободного ХС, связанного, по всей вероятности, с увеличением уровня ЭХС, обладающих меньшей метаболической активностью, в процессе этерификации избытка полиеновых ЖК [Брюзгина Т.С. и соавт., 1997]. Установлено, что усиление процессов ПОЛ может приводить к обогащению мембраны ХС.

Оценка состояния системы «ПОЛ/антиоксиданты» мононуклеаров крови после интенсивной фазы химиотерапии при ЛУТЛ позволила установить повышение (относительно нормы и показателей до лечения) концентрации ТБК-а и ДК, что в принципе согласуется с результатами флуоресцентного зондирования и объясняет тенденцию к снижению коэффициентов эксимеризации пирена в мембране мононуклеарных лейкоцитов на данном этапе исследования за счет накопления продуктов липопероксидации. Отмеченное увеличение активности СОД в лимфоцитах и моноцитах, видимо, является результатом адаптивно-компенсаторной реакции, хотя и недостаточной, в ответ на повышенное образование реактивного супероксид-аниона [Кольман Я., Рем К.-Г., 2000]. Регистрировалась обратная зависимость между активностью ПОЛ и параметрами флуоресценции при диссеминированной форме ЛУТЛ ($p < 0,05$), где интенсивность процессов была выше. Однако в условиях снижения микобактериальной нагрузки выявленное усиление процессов ПОЛ при ЛУТЛ позволяет связать данные изменения с токсическим действием ПТП. Иммунокомпетентные клетки характеризуются высоким уровнем экспрессии цитохрома P450. Чрезмерная продукция АФК при фармакологической нагрузке в норме регулируется повышенным уровнем цитокинов, в первую очередь, связанных с активацией макрофагов [Побезинский Л.А. и соавт., 2002]. Учитывая, что туберкулезный процесс сопровождается снижением способности мононуклеарных клеток вырабатывать провоспалительные цитокины [Фрейдлин И.С., Тотолян А.А., 2001; Железникова Г.Ф., 2002; Воронкова О.В. и соавт., 2005; Новицкий В.В. и соавт. 2005; 2006; 2007], можно предположить, что активация процессов ПОЛ в условиях химиотерапии ЛУТЛ связана с увеличением уровня цитохрома P450 и/или индукцией монооксигеназной активности. Негативным влиянием туберкулоstaticов можно объяснить также резкое снижение активности СОД в лимфоцитах.

ЛЧТЛ, по нашим данным, характеризовался тенденцией к нормализации показателей ПОЛ как в лимфоцитах, так и в моноцитах крови, в которых регистрировалось снижение концентрации ДК до нормального уровня. При этом активность СОД оставалась повышенной в моноцитах и нормализовалась в лимфоцитах при инфильтративной и диссеминированной формах ЛЧТЛ. По всей вероятности, снижение конечных продуктов ПОЛ в иммуноцитах при ЛЧТЛ является следствием уменьшения бактериальной нагрузки на организм. Однако все еще высокие (относительно контрольных значений) уровень ТБК-а и активность СОД могут, как и при ЛУТЛ, являться результатом побочного действия противотуберкулезных препаратов, связанных с индукцией цитохрома P450.

В фазу клинического выздоровления после окончания полного курса специфической противотуберкулезной химиотерапии у больных ТЛ отмечалась тенденция к нормализации всех показателей флуоресценции пирена вне зависимости от специфики мононуклеарных клеток, клинической формы заболевания и лекарственной чувствительности микобактерий к действию противотуберкулезных химиопрепаратов. При этом значения коэффициентов эксимеризации пирена и процента индуктивно-резонансного переноса энергии не достигали контрольных значений и оставались достоверно выше последних.

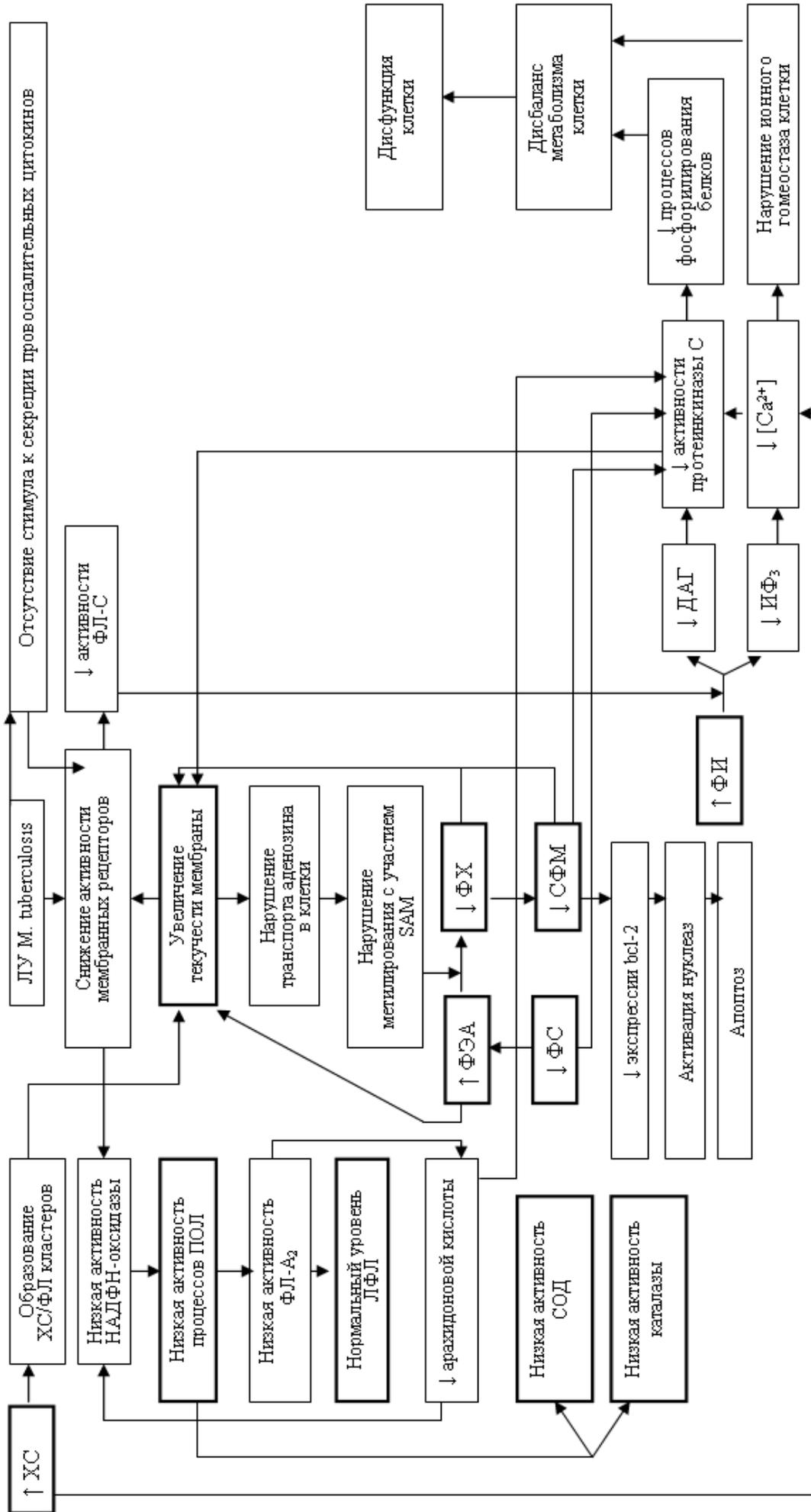


Рис. 4. Роль изменений липидной фазы мембраны, активности перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов в мононуклеарных лейкоцитах крови в дисфункции клеточного звена иммунитета при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких до начала лечения по данным литературных исследований (выделено жирным шрифтом). Примечание: ЛУ М. tuberculosis – лекарственно-устойчивые M. tuberculosis, ФХ – фосфатидилхолин, ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, СФМ – сфингомиелин, ЛФЛ – лизофосфолипиды, ХС – холестерин, ДАГ – диацилглицерол, ПФ₃ – инозитолтрифосфат, SAM – S-аденозилметенион, ФЛ-А₂ – фосфолипид А₂; ФЛ-С – фосфолипид С; СОД – супероксиддисмутаза.

Изменения показателей флуоресценции при ЛЧТЛ были напрямую связаны с изменениями в липидном спектре мембраны клеток, где в общей картине липидных фракций также отмечалась тенденция к нормализации, характеризующаяся увеличением до нормальных величин содержания СФМ, ФХ, ЭХС, ЖК и снижением уровня ФЭА, ЛФЛ. Процентное содержание ХС в мембране мононуклеаров крови соответствовало норме, но его абсолютная величина оставалась высокой при инфильтративном и фиброзно-кавернозном ЛЧТЛ. Повышенной текучести при нормальном уровне в мембране иммуноцитов СФМ и ФХ, содержащих в своем составе насыщенные ЖК, и высоком уровне ХС способствует затухание процессов ПОЛ, а также частичная нормализация активности СОД, видимо, связанные со снижением дозы ПТП на поддерживающем этапе лечения и не зависящие от продолжительности курса терапии. Подобное «жидкое» состояние липидной фазы, вероятно, поддерживается выявленным нами в ходе исследования увеличением пула общих фосфолипидов с преобладанием в нем фракций с ненасыщенными ЖК, в частности ФИ и ФЭА, высокая концентрация которых была зарегистрирована при данных формах ТЛ. Повышенное содержание ХС в мембране клеток приводит к мысли о том, что частичную «нормализацию» следует рассматривать не относительно показателей у здоровых доноров, а относительно исходного, патологически измененного состояния, зарегистрированного нами у пациентов с ТЛ до начала лечения, и, вероятно, не зависящего от факта инфицирования, но способствующего развитию заболевания.

Таким образом, полученные нами данные позволяют заключить, что при туберкулезе легких вне связи с лекарственной чувствительностью возбудителя и клинической формой заболевания отмечается выраженная дезорганизация липидной фазы мембраны иммунокомпетентных клеток крови как до начала специфической химиотерапии, так и на фоне ее проведения.

ВЫВОДЫ

1. Течение распространенного деструктивного лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких у лиц в возрасте 20-55 лет сопровождается перестройкой липидного бислоя мембраны мононуклеаров крови, в основе которой лежат однонаправленные изменения липидного спектра, уменьшение микровязкости анулярной и общей липидной фазы, нарушение белок-липидных контактов в плазматической мембране клеток, сохраняющиеся после полного курса противотуберкулезной химиотерапии.
2. Степень выраженности изменений структуры липидной фазы плазматической мембраны лимфоцитов и моноцитов при туберкулезе легких определяется клинической формой и вариантом заболевания. При этом она наиболее значительна при фиброзно-кавернозном туберкулезе легких с устойчивостью возбудителя к химиопрепаратам.
3. Туберкулез легких до лечения сопровождается активацией перекисного окисления липидов (увеличение концентрации ТБК-активных соединений и диеновых конъюгатов) и супероксиддисмутазы при лекарственно-чувствительном варианте и отсутствием изменений (за исключением повышения активности ферментов антиоксидантной защиты при диссеминированной форме) в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с лекарственно-устойчивым вариантом заболевания.
4. Клиническая манифестация туберкулеза и хронической обструктивной болезни легких сопровождается сходными изменениями микровязкости, фосфолипидного состава мембраны, активности перекисного окисления липидов и антиоксидантных ферментов в мононуклеарных лейкоцитах крови, наиболее выраженными в моноцитах при

неспецифической инфекционной патологии легких. При этом отличительным признаком структурных нарушений при туберкулезе является повышенное содержание холестерина в плазматической мембране иммунцитов.

5. Мембранодеструктивное действие противотуберкулезной химиотерапии обусловливается усилением перекисного окисления липидов и увеличением содержания лизофосфолипидов в мононуклеарных лейкоцитах. При этом оно проявляется в большей степени при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких на этапе интенсивного лечения.
6. Тенденция к нормализации липидного спектра, показателей липопероксидации и ферментативной антиоксидантной защиты в иммунocyтaх после курса поддерживающей химиотерапии наиболее выражена при диссеминированной форме лекарственно-чувствительного и лекарственно-устойчивого туберкулеза легких.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Новицкий, В. В. Цитогенетический статус лимфоцитов периферической крови при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Материалы международной научно-практической конференции «Проблемы туберкулеза и современные пути их решения», посвященной 80-летию противотуберкулезной службы Томской области, 75-летию кафедры фтизиатрии и пульмонологии СибГМУ (Томск, 7-8 октября 2004 г.). – Томск, 2004. – С. 76.
2. Филинюк, О. В. Функциональные и цитохимические особенности фагоцитов у больных туберкулезом легких / О.В. Филинюк, Н.А. Земляная, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2005. – №1. – С. 24-27.
3. Есимова, И. Е. Структурные особенности мембран мононуклеарных лейкоцитов крови при инфильтративном туберкулезе легких / И.Е. Есимова, О.В. Воронкова, Т.А. Шилько и др. // Сборник материалов IV Всероссийской университетской научно-практической конференции молодых ученых и студентов по медицине. – Тула, 2005. – С. 43-44.
4. Есимова, И. Е. Оценка микровязкостных свойств мембран мононуклеарных лейкоцитов крови у больных туберкулезом легких / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, О.В. Воронкова и др. // Материалы VI конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 19-20 мая 2005 г.). – Томск: СибГМУ, 2005. – С. 74.
5. Воронкова, О. В. Функциональный статус моноцитов периферической крови при лекарственно-устойчивом туберкулезе легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, В.А. Синицына и др. // Материалы VI конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 19-20 мая 2005 г.). – Томск: СибГМУ, 2005. – С. 21-22.
6. Есимова, И. Е. Особенности окислительного дисбаланса в мононуклеарах крови больных туберкулезом легких / И.Е. Есимова, О.И. Уразова, Т.А. Шилько // Материалы Международного конгресса «Иммунитет и болезни: от теории к терапии» (Москва, 3-8 октября 2005 г.). – Аллергология и иммунология в педиатрии. – 2005. – Т. 6, №5. – Прил. 1. – С. 203.
7. Воронкова, О. В. Особенности цитокинсекретирующей активности мононуклеарных лейкоцитов крови при туберкулезе легких / О.В. Воронкова, О.И. Уразова, И.Е. Есимова и др. // Материалы XI межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2005 г.). – СПб., 2005. – С. 7-9.
8. Рябова, Е. А. Особенности хромосомной дезорганизации лимфоцитов крови при туберкулезе легких / Е.А. Рябова, О.И. Уразова, Т.А. Лукьянова и др. // Материалы XI межвузовской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 21-22 апреля 2005 г.). – СПб., 2005. – С. 66-68.
9. Новицкий, В. В. Цитогенетический статус лимфоцитов периферической крови при туберкулезе легких до лечения и на фоне химиотерапии / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – №5. – С. 43-46.
10. Новицкий, В. В. Цитокинпродуцирующая активность мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных туберкулезом легких до лечения и на фоне химиотерапии /

- В.В. Новицкий, В.А. Синицина, О.В. Воронкова и др. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – №6. – С. 39-42.
11. Новицкий, В. В. Активность ПОЛ и апоптоза при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, С.Б. Ткаченко и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005, Т. 140, №11. – С. 497-499.
 12. Новицкий, В. В. Особенности поверхностного фенотипа лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Медицинская иммунология. – 2005. – Т. 7, №5-6. – С. 587-592.
 13. Новицкий, В. В. Мононуклеарные клетки периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких / В.В. Новицкий, О.И. Уразова, А.К. Стрелис и др. // Вестник РАМН. – 2006. – №2. – С. 30-35.
 14. Есимова, И.Е. Структурные особенности мембран и интенсивность процессов перекисного окисления липидов в мононуклеарах крови при диссеминированном туберкулезе легких / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис и др. // Фундаментальные исследования. – 2006. – №2. – С. 75-76.
 15. Серебрякова, В. А. Характеристика гуморального иммунного ответа у больных туберкулезом легких до и в динамике противотуберкулезной химиотерапии / В.А. Серебрякова, В.В. Новицкий, А.К. Стрелис и др. // Фундаментальные исследования. – 2006. – №2. – С. 82.
 16. Новицкий, В. В. Активность системы ДНК-репарации мононуклеаров крови при туберкулезе легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирского отделения Российской академии медицинских наук. – 2006. – №1. – С. 53-55.
 17. Есимова, И.Е. Характеристика липидного спектра мембран мононуклеарных клеток крови при туберкулезе легких / И.Е. Есимова, Р.Р. Хасанова // Материалы VII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» (Томск, 18-19 мая 2006 г.). – Томск: СибГМУ, 2006. – С. 125-126.
 18. Новицкий, В. В. Макро- и микроэлементы мононуклеаров крови у больных туберкулезом легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Микроэлементы в медицине. – 2006. – Т. 7, Вып. 2. – С. 33-38.
 19. Новицкий, В. В. Особенности функциональной активности лимфоцитов крови у больных туберкулезом легких / В.В. Новицкий, А.К. Стрелис, О.И. Уразова и др. // Иммунология. – 2006. – Т. 27, №2. – С. 76-79.
 20. Есимова, И. Е. Микровязкость и липидный спектр мембраны мононуклеарных лейкоцитов крови у больных туберкулезом легких / И.Е. Есимова, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – Т. 66, №8. – С. 15-18.
 21. Стрелис, А. К. Продукция оксида азота мононуклеарами крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких / А.К. Стрелис, В.В. Новицкий, О.И. Уразова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – Т. 5, №4. – С. 57-61.
 22. Филинюк, О. В. Цитохимическая и микробицидная активность фагоцитов крови у больных туберкулезом легких / О.В. Филинюк, Н.А. Земляная, А.К. Стрелис и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – Т. 6, №1. – С. 62-66.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДК – диеновые конъюгаты	СФМ – сфингомиелин
ЖК – жирные кислоты	ТБК-а – ТБК-активные продукты
ЛПВП – липопротеины высокой плотности	ТЛ – туберкулез легких
ЛУТЛ – лекарственно-устойчивый туберкулез легких	ФИ – фосфатидилинозитол
ЛФЛ – лизофосфолипиды	ФС – фосфатидилсерин
ЛЧТЛ – лекарственно-чувствительный туберкулез легких	ФХ – фосфатидилхолин
МБТ – микобактерии туберкулеза	ФЭА – фосфатидилэтаноламин
ПОЛ – перекисное окисление липидов	ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких
ПТП – противотуберкулезные препа	ХС – холестерин
СОД – супероксиддисмутаза	ЦПМ – цитоплазматическая мембрана
	ЭХС – эфиры холестерина

Автор выражает глубокую признательность заведующему кафедрой фтизиатрии и пульмонологии ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д.м.н., профессору, чл.-корр. РАМН А.К. Стрелису, заведующему ЦНИЛ ГОУ ВПО «СибГМУ Росздрава», д.м.н., профессору А.Н. Байкову, главному врачу ОГУЗ «Томская областная туберкулезная больница», к.м.н. Г.В. Яновой, главному врачу ОГУЗ «Томский областной противотуберкулезный диспансер» С.П. Мишустину, зам. главного врача В.Т. Голубчиковой, заведующей бактериологической лабораторией В.Е. Павловой, заведующей пульмонологическим отделением Томской городской больницы №3 И.В. Березко, главному врачу МЛПМУ «Поликлиника №5» С.И. Коваленко, зам. главного врача Г.А. Бутусовой за проявленный интерес к работе, ценные методические рекомендации, а также помощь в организации исследований.