

достоверно выше при острой очаговой пневмонии за счет бактерий, располагающихся внутри клеточных элементов (нейтрофилы, моноциты, эпителиальные клетки).

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Метод комплексного вскрытия аорты и сердца без пересечения венечных артерий // *Арх.пат.*— 1962.— №11.— С.79—82.
2. Вишнякова Л.А. Роль вирусных бактериальных инфекционных процессов в этиологии и патогенезе острых воспалительных заболеваний бронхов и легких // *Журн.микробиол.*— 1988.— №5.— С.105—109.
3. Воронина Л.М., Копьева Т.Н., Грובה О.М. и др. Персистенция воспаления в легких при бронхоэктатической болезни и микрофлора // *Всероссийский симпозиум «Патогенез хронического воспаления»*: Тезисы.— Новосибирск, 1991.— С.13—14.
4. Воронина Л.М., Карабиненко А.А. Иммунофлуоресцентное вирусологическое, иммунопероксидазное и количественное бактериоскопическое исследование в диагностике внебольничной острой очаговой пневмонии // *National Conferention on Pathology*: Thesis.— Varna, 1990.— P.53.
5. Зубков М.Н., Гуцуцидзе Е.Н., Ноников В.Е. Микробиологическая диагностика неспецифической бронхолегочной инфекции // *Актуальные вопросы пульмонологии.*— М., 1988.— Ч.1.— С.7—9.
6. Картавова В.А., Вишнякова Л.А., Кобрин Л.И., Медвянский Б.В. Рентгенологические особенности острых нагноительных процессов легких в зависимости от этиологического фактора // *Пульмонология.*— 1992.— №2.— С.29—32.
7. Копьева Т.Н., Бармина Г.В., Грובה О.М., Воронина Л.М. Местные механизмы защиты при хроническом неспецифическом воспалении в легких // *Арх.пат.*— 1992.— №9.— С.5—12.
8. Хронический бронхит: спорные и нерешенные вопросы // *Пульмонология.*— 1991.— №1.— С.9—15.
9. Свищев А.В., Черняев А.Л., Журавлев Н.В. Корреляционный анализ органомерических параметров сердца в норме и патологии // *Арх.пат.*— 1979.— №6.— С.24—29.
10. Свищев А.В. Внутрисердечные объемные параметры при хронической сердечно-сосудистой недостаточности по материалам аутопсий // *Там же.*— 1981.— №9.— С.30—35.
11. Чучалин А.Г. Актуальные вопросы пульмонологии // *Пульмонология.*— 1991.— №1.— С.6—8.
12. Shanson D. Gram staining of sputum // *Med. Intern.*— 1982.— Vol.1.— P.6—7.

Поступила 24.02.93.

© С.Ю.ЛАНДЫШЕВ, 1993

УДК 616.24-002-07:616.155.1-092

С.Ю.Ландышев

МИКРОВЯЗКОСТЬ МЕМБРАН ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРОТЕКУЩЕЙ И ЗАТЯЖНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ ФОСФОЛИПОСОМАМИ

Кафедра пропедевтики внутренних болезней Благовещенского Государственного медицинского института

THE MICROVISCOSITY OF ERHYTROCITE MEMBRANES IN PATIENTS WITH ACUTE AND PROLONGED PNEUMONIA AND ITS CORRECTION WITH PHOSPHOLIPOSOMES.

S.Y. Landyshev.

S u m m a r y

Values S of the microviscosity of erythrocyte membranes (EM) (values of lipid wellregulation within the membrane) and the Tau-value (the correlation time of rotation rate) were studied with the technique of the electrone spin resonance using spin probes. The activity of POL was determined by the malone dialdehyde concentration. The investigations performed in 10 healthy donors, 12 patients with acute pneumonia and 13 patients with prolonged pneumonia allowed to discover enhancement of S-value indicating the increase in the microviscosity of the outer layer of EM and decrease in the microviscosity of inner layer in patients with pneumonia. In patients with prolonged pneumonia a normalization of spin-labelled probe parameters in EM occurred after inhalation therapy with using liposomes containing intal and prednison, which was combined with the disappearance of clinico-roentgenological manifestations of pneumonia. Changes in microviscosity of EM indicate the structural rebuilding of EM in pneumonia.

Р е з ю м е

Значения вязкости S (величина липидной регуляции стабильности внутри мембраны) и τ (время корреляции соотношения вращения) изучались при помощи техники электронного спинового резонанса с использованием спиновых проб. Активность ПОЛ определялась по концентрации малонового диальдегида. Исследования, проводимые на 10 здоровых донорах, на 12 больных с острой пневмонией и на 13 — с затяжной, позволили выявить увеличение величины S, что указывает на увеличение микровязкости внешнего слоя мембраны эритроцитов (МЭ) и снижение микровязкости внутреннего слоя у пациентов с пневмонией. В случае затяжной пневмонии происходила нормализация параметров меченых спиновых проб МЭ после ингаляционной терапии с использованием липосом, содержащих интал и преднизолон, которая сочеталась с исчезновением клинико-рентгенологических проявлений пневмонии. Изменения микровязкости МЭ указывают на структурные восстановления их при пневмонии.

В последние годы отмечен рост числа больных острой пневмонией, частый переход ее в затяжное течение, который составляет в различных регионах страны от 11 до 70%. Это заставляет искать новые нетрадиционные методы ранней диагностики и лечения пневмонии.

Особенности течения инфекционных воспалительных заболеваний легких в значительной степени обусловлены изменением физико-химических свойств биомембран [10]. Интегральным показателем состояния мембран является их вязкость, которая лимитирует функционирование мембранных рецепторов, ферментов и переносчиков [4]. Мембраны эритроцитов (МЭ) являются общепризнанной моделью структурно-функционального состояния клеточной мембраны, в том числе и легких [10]. Основной причиной нестабильности клеточных мембран при пневмониях считается интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ), протекающая по свободнорадикальному пути [9]. Нормальная структурная (липидная) организация мембран является естественным антиоксидантом [3].

В связи с этим представляется целесообразным изучение взаимосвязи ПОЛ и вязкости мембран. Физико-химическое состояние мембран может служить показателем степени адаптации к воздействию инфекционно-токсического фактора на клетку. В отдельных работах [1,5,12] при неспецифических заболеваниях легких изучался фосфолипидный состав мембран эритроцитов, однако полученные данные противоречивы, что, видимо, связано с использованием недостаточно точного метода тонкослойной хроматографии.

Применение метода электронного парамагнитного резонанса с использованием спиновых зондов позволяет получить информацию о структуре мембраны на различной глубине, не внося изменений в ее структурно-функциональную организацию.

В качестве спиновых зондов для исследования мембран эритроцитов мы использовали спин-меченые аналоги 5-доксилстеариновой (зонд 1) и 16-доксилстеариновой (зонд 2) кислот фирмы «Sigma» (США). Спиновые зонды вводили в суспензию эритроцитов в виде этанольного раствора. Концентрация эритроцитов в образце составила $4-6 \cdot 10^9$ клеток/мл в 10 мМ трис-НС-буфера рН 7,4, содержащего 150 мМ NaCl, зонда $5 \cdot 10^{-5}$ М, этанола 1% (об/об). Спектры ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «JEOL-ГХ6» (Япония) при температуре 37°C. Условия записи спектров были как в работе Панасенко и др. [7]. Из спектров зондов, включенных в мембраны клеток, рассчитывали параметр упорядоченности S и время корреляции вращений τ , малоновый диальдегид (МДА) в мембранах эритроцитов определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

Липосомы изготовлены во Всесоюзном кардиологическом центре методом диспергирования содержания интала 0,11 мг/мл, преднизолона 0,25 мг/мл, во внутреннем объеме. Стерилизация осуществлялась автоклавированием при температуре 120°C. Материалы: яичный фосфатидилхолин — ФХ и холестерин — ХЛ (Харьковское предприятие биопрепаратов). Соотношение ФХ/ХЛ = 7:2. Относительное количество продуктов ПОЛ определяли по содержанию субстанций,

реагирующих с ТБК. Пирогенность оценивали при введении кроликам в дозе 10 мл/мг (НС1 пироген). Проверка на стерильность и абактериальность липосом проведена в НИИ микробиологии (г. Москва). Функция внешнего дыхания у больных пневмонией исследовалась методом бодиплетизмографии на аппарате фирмы «Jaeger».

Нами изучено состояние микровязкости мембран эритроцитов и уровня МДА у 25 больных пневмонией: 13 больных остротекучей пневмонией (ОП) и 12 больных с затяжным течением пневмонии (ЗП) в динамике (в первые 5 суток после госпитализации и на 28—62-й день заболевания). Отбор больных с возможным развитием затяжного течения пневмонии осуществлялся на основании наличия у них факторов риска: длительные сроки госпитализации с момента начала заболевания — свыше 7 суток (у 10 больных), проведение нерациональной антибактериальной терапии; без учета чувствительности микрофлоры мокроты к антибиотикам (у 8 больных), наличие в анамнезе частых ОРВИ, свыше 2—3 раз в год (у 5 больных), острая пневмония в анамнезе (у 3 больных), курение (у 7 больных), злоупотребление алкоголем (у 3 больных), профессиональные вредности (запыленность, загазованность, переохлаждение — у 4 больных), наличие аллергии в анамнезе (у 2 больных), частый прием антибактериальных препаратов в анамнезе (у 4 больных). У всех обследованных больных ЗП имелось не менее 4 факторов риска. Возраст больных 21—52 года (мужчин было 8, женщин — 4).

По степени дыхательной недостаточности (ДН) больных ЗП распределялись следующим образом: ДН₀ 4 больных, ДН I ст. — 6 больных, ДН II ст. — 2 больных. Активность воспалительного процесса по клинико-лабораторным показателям диагностирована I ст. — у 9 больных, II ст. — у 3 больных. Крупозная пневмония имела у 2 больных ЗП, очаговая — у 10 больных. Локализация воспалительного процесса в верхних долях у 5 больных, в нижних — у 6, в средней доле — у 1 больного.

В группе больных остротекучей пневмонией выявилось не более трех факторов риска на развитие ЗП. Все больные были своевременно госпитализированы. Возраст больных 16—63 года, мужчин было 8, женщин — 5. ДН отсутствовала у 5 больных, у 4 имела I ст. ДН, у 3 — II ст. ДН и у 1 больного — III ст. Активность воспалительного процесса I ст. у 5 больных, II ст. — у 5, III ст. — у 3 больных. Крупозная пневмония диагностирована у 4 больных, очаговая — у 9 больных. Локализация воспалительного процесса в верхней доле — у 2 больных, нижней доле — у 9, средней и нижней доле — у 2 больных.

Нарушение функции внешнего дыхания (ФВД) у больных ЗП проходило преимущественно по смешанному типу с преобладанием обструктивного компонента, снижением бронхиальной проходимости на уровне мелких и средних бронхов. Так, ЖЕЛ в этой группе больных составила $4,83 \pm 0,24$ л, ОФВ₁ $3,47 \pm 0,19$, тест Тиффно $72,2 \pm 1,2\%$, ЖЕЛ₂₅ $1,33 \pm 0,06$, ЖЕЛ₅₀ $4,21 \pm 0,24$, ЖЕЛ₇₅ $7,91 \pm 0,28$.

В группе больных ОП преобладал рестриктивный тип нарушения внешнего дыхания: ЖЕЛ $4,16 \pm 0,16$; ОФВ₁ $78,6 \pm 0,14$; ЖЕЛ₂₅ $1,44 \pm 0,08$; ЖЕЛ₅₀ $4,22 \pm 0,20$; ЖЕЛ₇₅ $7,86 \pm 0,22$. Все больные получали традиционную терапию с применением антибиотиков с учетом

характера микрофлоры мокроты и чувствительности к ним, муколитиков, нестероидных противовоспалительных средств, дезинтоксикационной терапии, физиолечения.

Для исследования структурных изменений в мембране эритроцитов мы применяли метод спиновых зондов, в качестве которых использовали аналоги стеариновой кислоты, спин-меченые у 5-го и 16-го атомов углерода. Как известно, жирнокислотные спиновые зонды в биологических мембранах ориентируются вдоль ацильных цепей фосфолипидов [2], а локализация «репортерной» нитроксильной группы в разном положении углеводородной цепи зонда позволяет получить информацию с разной глубины липидного слоя.

У больных ОП в разгар заболевания при поступлении наблюдалось достоверное увеличение параметра S для зонда 1 по сравнению со значением этого параметра в мембранах эритроцитов, выделенных из крови здоровых доноров (табл.). Эти данные свидетельствуют о том, что у больных ОП уменьшилась подвижность углеводородных цепей зонда 1 на глубине 0,5—0,7 нм [14] от поверхности мембраны (от поверхности раздела липид—вода) и соответственно уменьшилась подвижность (увеличилась упорядоченность) тех участков липидных молекул, которые окружают нитроксильные группы этих зондов.

Данные, полученные с помощью зонда 2, указывают, что у больных ОП при наличии активного воспалительного процесса происходит уменьшение значений τ (времени корреляции вращений) для нитроксильных групп, расположенных на глубине 2,0—2,2 нм от поверхности мембраны, что свидетельствует об увеличении вращательной подвижности этих групп и показывает уменьшение вязкости липидной фазы в микроокружении этих групп.

Аналогичные данные для зондов 1 и 2 получены в группе больных ЗП, у которых исследования проведены при поступлении в стационар. Таким образом,

изменения микровязкости мембран эритроцитов при наличии активного пневмонического очага у больных ОП и ЗП характеризуются повышением микровязкости наружного слоя и снижением микровязкости внутреннего слоя, что указывает на изменение липидного состава мембран.

После традиционной терапии у больных ОП наступило клиническое улучшение на 10—16-й день, исчезла инфильтрация в легочной ткани, произошла нормализация лабораторных показателей. Контрольную группу составили 10 больных затяжной пневмонией, получавших традиционную терапию, сопоставимые по степени тяжести пневмонии, степени ДН и активности воспалительного процесса. Микровязкость мембран эритроцитов в этой группе была: $S 0,622 \pm 0,002$; $\tau 1,52 \pm 0,002$.

После проведения курса традиционной терапии в течение 7 дней у этой группы полное клинкорентгенологическое выздоровление наступило только у 3 больных, у 2 отмечена положительная динамика в виде уменьшения клинических проявлений и исчезновения инфильтрации в легких, но сохранялось усиление легочного рисунка, у 5 положительная динамика отсутствовала. Показатели микровязкости после лечения сохранялись прежними ($S 0,62 \pm 0,002$; $\tau 1,53 \pm 0,002$), что свидетельствует о сохраняющихся нарушениях структурного состояния липидной фазы мембран. Активность ПОЛ по МДА в мембранах снижалась.

В группе наблюдения (12 больных ЗП) к 28-му дню заболевания сохранялись клинические симптомы в виде кашля, недомогания, слабости, одышки после умеренной физической нагрузки, инфильтрация в легочной ткани, ускоренная СОЭ (у 7 чел.), лейкоцитоз (у 3), положительные острофазовые реакции (у 2).

После проведения курса ингаляционной терапии фосфолипосомами, нагруженными инталом — 0,11 мг и преднизолоном — 0,25 мг на ингаляцию, в течение 6 дней у больных ЗП нормализовались параметры S (зонд 1) и τ (зонд 2) — см. табл.

Т а б л и ц а

Параметры упорядоченности S для зонда 1 и время корреляции вращений τ для зонда 2, встроенных в мембраны эритроцитов при температуре 37° С, изменения малонового диальдегида у больных острой и затяжной пневмонией до и после лечения фосфолипосомами ($M \pm m$)

Группа обследованных	Число обследованных	S (зонд 1)	τ НС (зонд 2)	МДА, мкг/мл
1. Здоровые доноры	10	$0,614 \pm 0,003$	$1,58 \pm 0,001$	$0,196 \pm 0,02$
2. Контрольная группа больных ЗП:				
а) до лечения	10	$0,622 \pm 0,002^*$	$1,52 \pm 0,002$	$0,312 \pm 0,04^{**}$
б) после лечения	10	$0,621 \pm 0,002^*$	$1,53 \pm 0,002^*$	$0,280 \pm 0,03^*$
3. Группа наблюдения:				
Больные ОП и ЗП до лечения липосомами	25	$0,621 \pm 0,002^{**}$	$1,53 \pm 0,002^*$	$0,338 \pm 0,04^{**}$
4. Больные ЗП:				
а) до лечения липосомами	12	$0,623 \pm 0,002^{**}$	$1,53 \pm 0,002^*$	$0,281 \pm 0,05$
б) после лечения липосомами	12	$0,615 \pm 0,002$	$1,59 \pm 0,002$	$0,319 \pm 0,06$
		$p_{2a-2b} > 0,05;$ $p_{4a-4b} < 0,01;$	$p_{2a-2b} > 0,5;$ $p_{4a-4b} < 0,05;$	$p_{2a-2b} > 0,05;$ $p_{4a-4b} > 0,05;$

П р и м е ч а н и е. Звездочка — $p_r < 0,05$; две звездочки — $p_r < 0,01$.

У всех больных отмечено улучшение состояния, нормализация рентгенологической картины и лабораторных данных на 7—10-й день после начала лечения липосомами.

Таким образом, при наличии инфильтративных изменений в легких у больных ЗП выявились структурные изменения липидной фазы мембран эритроцитов, которые исчезли после курсового лечения аэрозолем фосфолипосом с инталом и преднизолоном, что является свидетельством их мембраностабилизирующего действия.

Сопоставление содержания МДА в мембранах эритроцитов с параметрами спиновых зондов показало наличие отрицательной корреляционной связи с параметрами S зонда 1 ($r = -0,41$). Уровень МДА при поступлении был повышен как у больных ОП, так и у больных ЗП, но в большей степени повышался у больных ОП. После лечения больных ЗП фосфолипосомами с инталом и преднизолоном МДА нарастал, что может быть следствием повышенного образования МДА вследствие увеличения субстрата окисления в связи с накоплением фосфатидилхолина (ФХ) в мембранах. Повышение МДА является косвенным свидетельством «тлеющего» воспаления и указывает на необходимость диспансерного наблюдения за больными ЗП.

Таким образом, при острой и затяжной пневмонии происходит повышение вязкости мембран вследствие повышенного расхода ненасыщенных фосфолипидов в процессе ПОЛ под действием мембранных фосфолипаз, что может быть расценено как компенсаторно-приспособительная реакция. Накапливающиеся в мембранах сфингомиелин и холестерин, повышая вязкость наружного слоя мембраны, нарушают барьерную и матриксную функцию бислоя.

Для нормального функционирования мембранных рецепторов и ферментных систем большое значение имеет молекулярная подвижность в мембране. Длительное повышение вязкости мембран при затяжной пневмонии может приводить к нарушению функции клеток, что требует своевременной коррекции. Использование фосфолипосом, содержащих интал и преднизолон, у больных ЗП обусловлено многогранным взаимоусиливающим патогенетическим действием препарата ФХ, составляющего основу липосом, который может входить в структуру сурфактанта, а также включается в другие клеточные мембраны.

Интал, стабилизируя тучные клетки, устраняет выделение ими активных форм кислорода и простагландина D_2 — мощного бронхоконстриктора [13].

У больных затяжной пневмонией находили значительное снижение кортизола в крови во все сроки заболевания [8], что является основанием для использования в терапии этих больных глюкокортикоидных гормонов. Преднизолон в низких концентрациях не влияет на микробицидную функцию активированных макрофагов, разобщает патологическую связь Т-лимфоцитов и макрофагов, поддерживающих воспалительный процесс, блокирует стимулирующий эффект липополисахаридов и лимфокинов [6], способствует репаративным процессам в легких, блокирует фосфолипазу A_2 [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аряев Н.Л.* Клинико-патогенетическое значение изменений структуры и функции биомембран при заболеваниях легких у детей: Автореф. дис. ... канд.мед.наук.— Одесса, 1984.
2. *Берлинер Л.* Метод спиновых меток. Теория и применение: Пер. с англ.— М.: Мир, 1979.
3. *Блюгер А.Ф., Смоголь В.А., Сондоре В.Ю.* Современные методы изучения обмена липидов // Изменение липидного обмена при патологии внутренних органов.— Рига, 1987.— С.5—10.
4. *Бурлакова Е.В., Голощанов А.Н., Керимов А.А.* Взаимосвязь между содержанием природных антиоксидантов и вязкостью липидов в мембранах органелл в норме // Бюл. экспер. биол.— 1986.— № 4.— С. 431—433.
5. *Иванов Е.М., Новгородцева Т.П., Эндакова Э.А. и др.* Фосфолипидный спектр сыворотки крови больных хроническими неспецифическими заболеваниями легких в процессе восстановительного лечения // Тер. арх.— №3.— С. 94—97.
6. *Маянский Д.М.* Хроническое воспаление.— М.: Медицина, 1991.
7. *Панасенко О.М., Тирзите Д.Я., Тирзит Г.Д. и др.* Применение спинменченых липидных зондов в исследовании биологических мембран // Биол. мембраны.— 1984.— Т.1, № 9.— С.919—925.
8. *Панфилов Ю.А., Шаронов В.Г.* Некоторые нарушения в системах гипофиз-надпочечники и гипофиз-щитовидная железа у больных острой пневмонией и пути их терапевтической коррекции // Тер. арх.— 1990.— № 3.— С.19—22.
9. *Сафарян М.Д., Карагезян К.Г.* Роль сочетанного применения α -токоферола, витамина С, нуклеината натрия в нормализации процессов перекисеобразования и антиокислительной активности крови при острой пневмонии // Клин. мед.— 1991.— № 7.— С.93—96.
10. *Сыромятникова Н.В., Гончарова В.Н., Котенко Т.В.* Метаболическая активность легких.— Л.: Медицина, 1987.
11. *Семенова А.А., Козлов Ю.П.* Метаболизм фосфолипидов и биомембраны.— Иркутск, 1988.
12. *Юлдашев К.Ю., Камиллов М.Х., Махмудова З.У. и др.* Эритроцитарные фосфолипиды, гемокоагуляция и состояние микроциркуляции у больных острой пневмонией // Клин.мед.— 1987.— № 3.— С.45—48.
13. *Holgati F., Beniony R., Howarth B.* // Int. Arch. Allergy.— 1985.— Vol. 77, N 1.— P. 47—56.
14. *Schreier-Muccillo S., March D.* // Arch. Biochem.— 1976.— Vol. 172, N 1.— P. 1—11.

Поступила 12.11.92.