

ISSN 2225-6016

ВЕСТНИК

*Смоленской государственной
медицинской академии*

Том 17, №4

2018



УДК 616.153.915-07

ВЛИЯНИЕ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ НА СОСТОЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕМБРАН У БОЛЬНЫХ КО-ИНФЕКЦИЕЙ ТУБЕРКУЛЁЗ И ВИЧ

© Макаров П.В.

Тверской государственной медицинской университет, Россия, 170100, ул. Советская, 4

Резюме

Цель. Определить влияние антиретровирусной терапии на состояние биологических мембран у больных с ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ.

Методика. Фосфолипидный спектр сыворотки крови был исследован у 100 больных с ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ и 50 здоровых лиц. Изучено относительное содержание следующих фракций общих фосфолипидов: суммарных лизофосфолипидов, сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина.

Результаты. Больные ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ, не получавшие антиретровирусной терапии через месяц от начала лечения отличались от здоровых лиц более низкими значениями коэффициента активности фосфолипаз, коэффициента проницаемости биомембран, коэффициента деструкции мембран и высокими коэффициента вязкости биомембран. Под влиянием антиретровирусной терапии у больных с ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ увеличивалась активность фосфолипаз, микровязкость и деструкция биомембран. Цифровые значения коэффициента проницаемости биомембран у них оказались достоверно ниже, чем у пациентов, которые не получали данный вид лечения.

Заключение. Антиретровирусная терапия больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ вызывает активную деструкцию мембран лёгочной ткани, способствует обеспечению более высокого лечебного эффекта, так как происходит интенсивное уничтожение пораженных МБТ тканей. При отсутствии антиретровирусной терапии у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ наблюдается низкая или отсутствие деструкции пораженных тканей, что не препятствует распространению, инфильтрации микобактериями лёгочных полей.

Ключевые слова: ко-инфекция ВИЧ-инфекция, туберкулёз, антиретровирусная терапия

ANTIRETROVIRAL THERAPY INFLUENCE ON BIOLOGICAL MEMBRANES CONDITION IN PATIENTS WITH TUBERCULOSIS AND HIV CO-INFECTION

Makarov P.V.

Tver State Medical University, 4, Sovetskay St., Tver, Russia

Abstract

Objective. To study antiretroviral therapy influence on the state of biological membranes in patients with tuberculosis/HIVco-infection.

Methods. Blood serum phospholipids spectrum was analysed in 100 patients with tuberculosis/HIVco-infection and in 50 healthy patients. The relative content of the following fractions of total phospholipids was assessed: lisophospholipids, sphingomielin, phosphatidilholin, phosphatidiletanolamin.

Results. The patients with tuberculosis / HIVco-infection not receiving antiretroviral therapy one month following the onset of treatment, had lower values of phospholipase activity, membrane permeability coefficient, coefficient of membranes destruction and high coefficient of membranes viscosity compared to healthy persons. Under the influence of antiretroviral therapy, the patients with tuberculosis/HIVco-infection had a more pronounced phospholipase activity, microviscosity and membrane destruction. The digital values of membrane permeability coefficient were lower, than in patients, who did not undergo the treatment.

Conclusion. Antiretroviral therapy of patients with tuberculosis / HIV co-infection causes active destruction of lung tissues membranes, promotes maintenance of higher medical effect, as there is an intensive destruction of tissues damaged with tuberculosos mycobacterium. In the absence of antiretroviral therapy the patients with tuberculosis / HIV co-infection had a low or no destruction of damaged tissues, that does not interfere with distribution and infiltration of pulmonary fields with tubeberculosos mycobacterium.

Keywords: co-infection HIV-infection, tuberculosis, antiretroviral therapy

Введение

Известно, что липиды являются одной из важнейших составляющих всех клеток организма [13]. Непосредственно участвуя в обеспечении целостности строения мембран, фосфолипиды поддерживают множество клеточных функций. О состоянии биологических мембран можно судить по показателям фосфолипидных фракций сыворотки крови, так как известно, что фосфолипиды (ФЛ) входят в состав мембран клеток [5, 15] и, соответственно, всякое изменение содержания их на мембране приводит к изменению содержания их в крови.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) прогнозирует, что при повышении уровня распространенности ВИЧ-инфекции среди населения будет увеличиваться и заболеваемость туберкулезом [10, 20]. Туберкулез остаётся второй ведущей причиной смертности при ВИЧ-инфекции [18]. В связи с тем, что в последнее десятилетие отмечается значительный рост сочетанной патологии – туберкулез и ВИЧ-инфекция (ТБ/ВИЧ) и ситуация приобретает характер эпидемии [1, 4, 12] представляет интерес изучение состояния биологических мембран лёгких при ко-инфекции ВИЧ/туберкулез на основе изучения фосфолипидов сыворотки крови.

Цель – определить влияние антиретровирусной терапии (АРВТ) на состояние биологических мембран у больных с ко-инфекцией туберкулез/ВИЧ.

Методика

Работа одобрена этическим комитетом. Критериями включения больных в исследование были: наличие ВИЧ-инфекции (наблюдение, обследование и лечение в условиях СПИД центра), первичная диагностика туберкулеза, а также наличие уровня CD4 лимфоцитов ниже 250 клеток/мм³. Фосфолипидный спектр сыворотки крови был изучен у 50 больных (группа I) ВИЧ-инфекцией в стадии 4Б с лекарственно чувствительным инфильтративным туберкулезом лёгких (отказ больных от АРВТ); группа II – 50 больных ВИЧ-инфекцией в стадии 4Б с лекарственно чувствительным инфильтративным туберкулезом лёгких получавших лечение по 1-му стандартному режиму терапии и 50 здоровых лиц.

Режим химиотерапии туберкулеза формировали в соответствии с Федеральными клиническими рекомендациями на основе сведений о лекарственной устойчивости возбудителя [9]. В соответствии с данными рекомендациями лечение по I стандартному режиму включало в себя применение изониазида, рифампицина, пиразинамида и стрептомицина. Интенсивную фазу химиотерапии продолжали не менее 1 мес. За этот срок больной получил 30 доз в комбинации из 4 основных препаратов. Иммунологические исследования определения абсолютного количества CD4-лимфоцитов проводилось методом проточной цитометрии на анализаторе Cytomic FC 500 с применением моноклональных антител. Вирусная нагрузка определялась методом полимеразной цепной реакции на приборе Abbot m2000rt.

Липиды выделяли по Фолчу [17] и фракционировали модифицированным методом [7] с определением процентного содержания минорных липидных компонентов сыворотки крови одновременно с основными липидными фракциями с применением метода денситометрии и современного высокоточного денситометра Shimadzu CS-9000 (Япония). Изучено относительное содержание следующих фракций общих фосфолипидов (ФЛ) – суммарных лизофосфолипидов (ЛФЛ), сфингомиелина (СМ), фосфатидилхолина (ФХ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ). Результаты содержания каждого липида выражались в процентах относительно уровня общих фосфолипидов и в абсолютных величинах.

Деструкцию мембран определяли на основе разработанного В. К. Макаровым [6] коэффициента $\frac{ФХ^2}{СМ \times ЛФЛ}$ в модификации $\frac{[ФХ+ФЭ]^2}{СМ \times ЛФЛ}$. Данный коэффициент является производным двух показателей: коэффициента $\frac{СМ}{ФХ}$, который показывает уменьшение липидной «жидкости» мембран, то есть увеличение ее проницаемости [3] (коэффициент проницаемости) и коэффициента $\frac{ФХ}{ЛФЛ}$, указывающего на снижение активности эндогенных фосфолипаз, накопления лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на мембранах и их деструкции [6]. С целью упрощения использовали коэффициент $\frac{ФХ+ФЭ}{ЛФЛ}$ (коэффициент активности эндогенных фосфолипаз). Повышение его значений обратно пропорционально снижению активности фосфолипаз, т.е. указывает на снижение активности эндогенных фосфолипаз, что приводит к накоплению на биологических мембранах лизофосфолипидов и к их деструкции.

Таким образом, объединяли результаты двух биохимических процессов, направленных на разрушение печеночных клеток и в результате предполагалось, что должна проследиваться параллель между степенью проницаемости мембран и степенью возрастания активности

аминотрансфераз, стадией поражения печени. Кроме того, применяли коэффициент вязкости биомембран [8], который представляет собой отношение свободного холестерина к общим фосфолипидам, из которых и состоят мембраны клеток [СХ/ФЛ]. Существует оптимальное соотношение уровня свободного холестерина и общих фосфолипидов (СХ/ФЛ) в клетках макроорганизма. Каждое изменение в них этого соотношения проявляется изменением его значений в сыроворотке крови.

Все показатели пациентов проверялись на предмет выявления эмпирических функций их распределения и соответствие этих функций нормальной функции распределения (функция Гаусса). Для этой процедуры применялся критерий согласия Шапиро-Уилка, который применим при небольшом количестве измерений ($n < 50$). Сравнение групп проводилось двумя способами: для нормально распределённых показателей применялся Т-критерий Стьюдента, а в случае аномальности функций распределения – U-критерий Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

Сравнение цифровых значений коэффициентов (табл. 1) до лечения, которые определяют активность фосфолипаз [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ], проницаемость [СМ/ФХ], микровязкость [СХ/ФЛ], деструкцию биомембран [ФХ+ФЭ]²/[СМ×ЛФЛ] показало, что больные ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ значительно отличаются по показателям коэффициентов [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] и [ФХ+ФЭ]²/[СМ×ЛФЛ] от здоровых лиц. То есть, у них в первую очередь снижается активность фосфолипаз (обратно пропорционально увеличению цифровых значений коэффициента [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ]) и возрастает деструкция мембран, вероятно, за счёт ферментной активности самих микобактерий туберкулёза.

Цифровые значения означенных коэффициентов в группах 1 и 2 были близкими, за исключением коэффициента [ФХ+ФЭ]²/[СМ × ЛФЛ], который был несколько выше у больных 2-й группы.

Таблица 1. Значения соотношений фосфатидилхолина к лизофосфатидилхолину, сфингомиелина к фосфатидилхолину, свободного холестерина к фосфолипидам и коэффициента [ФХ+ФЭ]²/[СМ×ЛФЛ] у здоровых лиц и больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ по группам до начала лечения

Сравниваемые группы	n	Наименование коэффициентов			
		[ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ]	[СМ/ФХ]	[СХ/ФЛ]	[ФХ+ФЭ] ² /[СМ×ЛФЛ]
Здоровые лица	50	1,7 ± 0,07	0,6±0,01	0,7 ±0,01	3,4±0,07
ВИЧ/туберкулёз (группа 1)	50	2,1±0,02 ³	0,6±0,01	0,7±0,02	4,5±0,1 ³
ВИЧ/туберкулёз (группа 2)	30	2,3±0,05 ³	0,6±0,03	0,7±0,03 ³	5,1±0,2 ³

Примечание: 1, 2, 3 – достоверность различий показателей у больных ВИЧ/туберкулёз и здоровых лиц (¹ – $p < 0,05$, ² – $p < 0,01$, ³ – $p < 0,001$)

Больные ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ, не получавшие АРВТ, (табл. 2) через месяц от начала лечения отличались от здоровых лиц более низкими значениями коэффициента активности фосфолипаз [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ], коэффициента проницаемости биомембран [СМ/ФХ], коэффициента деструкции мембран [ФХ+ФЭ]²/[СМ×ЛФЛ] и высокими значениями коэффициента вязкости биомембран [СХ/ФЛ]. Под влиянием АРВТ у больных 2-й группы увеличивалась активность фосфолипаз [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ], микровязкость [СХ/ФЛ] и деструкция биомембран [ФХ+ФЭ]²/[СМ×ЛФЛ].

Цифровые значения коэффициента проницаемости биомембран [СМ/ФХ] у больных, получавших АРВТ были достоверно ниже, чем у пациентов 1-й группы, которые не получали данный вид лечения. Более высокие значения соотношений [ФХ+ФЭ]/[ЛФЛ] и коэффициента деструкции мембран [ФХ+ФЭ]²/[СМ×ЛФЛ] под влиянием АРВТ, в сравнении со здоровыми лицами и пациентами, которые не получали антиретровирусную терапию, указывают на значительное снижение активности эндогенных фосфолипаз, что приводит к накоплению на биологических мембранах альвеоцитов лизофосфолипидов и к их деструкции. Это, в свою очередь, может приводить к существенной деструкции лёгочной ткани, поражённой микобактериями туберкулёза.

Уменьшение соотношения СМ/ФХ у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ получавших АРВТ по сравнению с не получавшими показывает, что АРВТ вызывает увеличение «текучести», а значит и проницаемости биомембран, способствует проникновению туберкулоцидных препаратов

в пораженные микобактериями клетки лёгочной ткани.

Таблица 2. Значения соотношений фосфатидилхолина к лизофосфатидилхолину, сфингомиелина к фосфатидилхолину, свободного холестерина к фосфолипидам и коэффициента $[\text{ФХ}+\text{ФЭ}]^2/[\text{СМ}\times\text{ЛФЛ}]$ у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ через месяц от начала лечения

Сравниваемые группы	n	Наименование коэффициентов			
		$[\text{ФХ}+\text{ФЭ}]/[\text{ЛФЛ}]$	$[\text{СМ}/\text{ФХ}]$	$[\text{СХ}/\text{ФЛ}]$	$[\text{ФХ}+\text{ФЭ}]^2/[\text{СМ}\times\text{ЛФЛ}]$
Здоровые лица	50	$1,7 \pm 0,07$	$0,6 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,01$	$3,4 \pm 0,07$
ВИЧ/туберкулёз (группа 1)	50	$1,0 \pm 0,01^3$	$0,8 \pm 0,01^3$	$0,5 \pm 0,02$	$1,6 \pm 0,01^3$
ВИЧ/туберкулёз (группа 2)	50	$2,0 \pm 0,01^3$	$0,6 \pm 0,03^3$	$1,2 \pm 0,01^3$	$4,7 \pm 0,03^3$
P_1		$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$	$<0,001$

Примечание: 1, 2, 3 – достоверность различий показателей у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ (¹ – $p < 0,05$, ² – $p < 0,01$, ³ – $p < 0,001$). P_1 – достоверность различий показателей у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ 1-й и 2-й групп

Увеличение уровня фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина у больных с ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ под влиянием АРВТ по сравнению со здоровыми лицами и пациентами без данного вида терапии может быть результатом активации двух систем. Во-первых, увеличение их уровня в сыворотке крови и соответственно уменьшение на мембранах альвеоцитов может происходить под действием бактериальной инфекции за счёт снижения активности фосфолипазы A_2 [11], которая катализирует гидролиз эфирной связи глицерофосфолипидов в результате чего образуется лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты. Во-вторых, ФХ и ФЭА могут синтезироваться по альтернативному пути с участием лецитин-холестерол-ацилтрансферазы (ЛХАТ) [10].

Значительно более низкое содержание сфингомиелина сыворотки крови, приближение коэффициента СМ/ФХ у больных получавших АРВТ к норме может быть связано с повышением активности фермента сфингомиелинлипазы, осуществляющей гидролиз сфингомиелина [2]. Аналогичные изменения активности фосфолипаз, деструктивных процессов и проницаемости мембран были обнаружены у пациентов с сальмонеллёзной [9] и стрептококковой инфекцией [7]. Значительное увеличение значений коэффициента СХ/ФЛ показывает, что характерным для больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ при получении АРВТ является увеличение микровязкости мембран [16], что препятствует распространению инфекции в лёгочной ткани.

Выводы

1. Антиретровирусная терапия у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ вызывает активную деструкцию мембран лёгочной ткани, способствует достижению более высокого лечебного эффекта, так как происходит интенсивное уничтожение пораженных микобактериями туберкулёза тканей.
2. При отсутствии антиретровирусной терапии у больных ко-инфекцией туберкулёз/ВИЧ наблюдается низкая или отсутствие деструкции пораженных тканей, что не препятствует распространению, инфильтрации микобактериями лёгочных полей.

Литература (references)

1. Васильева, И.А., Таран Д.В. Проект по сбору и изучению лучших примеров организации лечения и клинического ведения больных туберкулёзом, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя и сочетанным с ВИЧ-инфекцией // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2014. – №15. – С. 3-6 [Vasil'eva, I.A., Taran D.V. *Tuberkulyoz i bolezni lyogkih*. Tuberculosis and lung diseases. – 2014. – N15. – P. 3-6. (in Russian)]
2. Вельтищев Ю.Е., Юрьева Э.А., Мусаев М.А., Шеманова Г.Ф. Фосфолипазы человека в норме и при патологии // Вопросы медицинской химии. – 1981. – № 4. – С. 441-449. [Vel'tishchev YU.E., Yur'eva E.N.A., Musaev M.A., Shemanova G.F. *Voprosy medicinskoj himii*. Problems of medical chemistry. – 1981. – N4. – P 441-449. (in Russian)]

3. Гурин В.И. Обмен липидов при гипертермии, гипотермии и лихорадке – Минск, 1986. – 192 с. [Gurin V.I. *Obmen lipidov pri gipertermii, gipotermii i lihoradke*. Exchange of lipids at hyperthermy, hypothermia and fever. – Minsk, 1986. – 192 p. (in Russian)]
4. Зими́на В.Н., Коше́чкин В.А., Кра́вченко А.В. Туберкулёз и ВИЧ-инфекция у взрослых. Руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014. – 224 с. [Zimina V.N., Koshechkin V.A., Kravchenko A.V. *Tuberkulyoz i VICH-infekciya u vzroslyh. Rukovodstvo*. Tuberculosis and HIV-infection for the adults. – M.: GEHOTAR-Media; 2014. – 224 p. (in Russian)]
5. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. Элиста, 1999. – 249 с. [Komarov F.I., Korovkin B.F., Men'shikov V.V. *Biohimicheskie issledovaniya v klinike*. Biochemical researches in clinic. – Elista, 1999. – 249 p. (in Russian)]
6. Кучаренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. – Киев, 1985. – 247 с. [Kucharenko N.E., Vasil'ev A.N. *Lipidy*. Lipids. – Kiev, 1985. – 247 p. (in Russian)]
7. Макаров В.К., Стариков С.В. Алкоголь, ангина и состояние биологических мембран // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. 2011. – №3. – С. 52-54. [Makarov V.K., Starikov S.V. *Voprosy biologicheskoy medicinskoj i farmacevticheskoy himii*. Problems of biological medical and pharmaceutical chemistry. – 2011. – N3. – P. 52-54. (in Russian)]
8. Макаров В.К., Левенцова А.Е. Состояние биологических мембран у больных острым инфекционным и острым алкогольным гастроэнтеритами // Токсикологический вестник. 2013. – №3. – С. 5-7. [Makarov V.K., Levencova A.E. *Toksikologicheskij vestnik*. The toxicological bulletin. – 2013. – №3. – P. 5-7. (in Russian)]
9. Макаров В.К., Макаров П.В. Роль состояния биологических мембран в дифференциальной диагностике сальмонеллёзного и острого алкогольного гастроэнтерита // Клиническая медицина. – 2015. – Т.93, №2. – С. 58-60. [Makarov V.K., Makarov P.V. *Klinicheskaya medicina*. Clinical medicine. – 2015. – V.93, N2. – P. 58-60. (in Russian)]
10. Титов В.Н. Сложные липиды кровотока: функциональная роль и диагностическое значение // Клиническая лабораторная диагностика. – 1997. – №12. – С. 3-10. [Titov V.N. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. Clinical laboratory diagnostic. – 1997. – N12. – P. 3-10. (in Russian)]
11. Марри Р., Греннер Д., Мейерс П., Родуэлл В. Биохимия человека /пер. англ/. М: Медицина; 1993. – Т.1, разд. II. – С. 111-298. [Marri R., Grenner D., Mejers P., Roduehll V. *Biohimiya cheloveka*. Human biochemistry. Moscow: Medicina, 1993. – V.1, part. II. – P. 111-298. (in Russian)]
12. Туберкулёз в Российской Федерации, 2012/2013/2014 гг. Аналитический обзор статистических показателей, используемых в Российской Федерации и в мире. – М., 2015. – 312 с. [Tuberkulyoz v Rossijskoj Federacii, 2012/2013/2014 gg. *Analiticheskij obzor statisticheskikh pokazatelej, ispol'zuemyh v Rossijskoj Federacii i v mire*. Tuberculosis in Russian Federation, 2012/2013/2014 гг. The state-of-the-art review of statistical metrics used in Russian Federation and in the world. – M., 2015. – 312 p. (in Russian)]
13. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя. – 2014. – 72 с. [Federal'nye klinicheskie rekomendacii po diagnostike i lecheniyu tuberkuleza organov dyhaniya s mnozhestvennoj i shirokoj lekarstvennoj ustojchivost'yu vzbuditelya. The federal clinical guidelines on diagnostics and treatment of breath organs tuberculosis with multiple and wide medicinal stability of an agent. – 2014. – 72 p. (in Russian)]
14. Щербакoва М.Ю. Нарушения липидного обмена. Педиатрия. 2000. – №4. – С. 76-80 [Shcherbakova M.YU. *Pediatriya*. Pediatrics. – 2000. – N 3. – P. 76-80 (in Russian)]
15. Crain R.C. Phospholipid transfer proteins as of membrane structure and function. *Subcellular Biochemistry*. – 1990. – N16. – P. 45-67.
16. Gracey M., Bobongie F. Hospitalization of Aboriginal adults for digestive disorders in Western Australia, 1989-91 // *Gastroenterology and Hepatology*. – 1995. – N3. – P. 313-318.
17. Folch J., Lees M., Stanley G.H.G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *Journal Biological Chemistry*. – 1957. – V26. – P. 497-509.
18. Mayer-Barber K.D., Andrade B.B., Oland S.D. et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. – *Nature*. – 2014. – V.511, N 7507. – P. 99-103.
19. World Health Organization: Guidelines for National Programme. Geneva, 2003. – 40 p.
20. World Health Organization: «Report of Lessons Learn» Workshop on the six ProTEST Pilot Projects in Malawi, South Africa and Zambia // WHO. – Geneva, 2004. – 40 p.

Информация об авторе

Макаров Павел Викторович – ассистент кафедры инфекционных болезней и эпидемиологии ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: global-create@yandex.ru