

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАН НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ БРОНХОЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И КОРРЕКЦИЯ ИХ АНТИОКСИДАНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Ляпина С.А.¹, Федотова Г.Г.²

¹ФГБОУ ВО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: dep-mail@adm.mrsu.ru;

²ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический институт им. М.Е. Евсевьева», Саранск, e-mail: mgpi@moris.ru

Статья посвящена изучению влияния антиоксидантных препаратов на интенсивность митохондриальной флуоресценции потенциал-чувствительного зонда-катиона 4-(*p*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиния (ДСМ) и активности перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетках при бронхолегочных заболеваниях. Рассмотрены особенности действия лекарственных препаратов (димефосфона и мексидола) на нейтрофилы при развитии антиоксидантного стресса. Наиболее эффективным средством, оказывающим свое позитивное воздействие на нейтрофилы, является димефосфон. Препарат увеличивает общую антиоксидантную активность и значительно угнетает интенсивность перекисного окисления липидов, в результате чего происходит регенерация мембранного аппарата клетки. Показано, что мексидол является ингибитором свободнорадикальных реакций, протекающих в нейтрофилах, изменяет структурно-функциональное состояние мембран, липид-белковые взаимосвязи, функции рецепторов и мембраносвязанных ферментов. Оба препарата являются мембраномодуляторами, изменяющими структурно-функциональные свойства мембран нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, бронхолегочные заболевания, антиоксидантные препараты, мембрана, димефосфон, мексидол, митохондрии, перекисное окисление липидов (ПОЛ).

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF NEUTROPHIL MEMBRANES IN BRONCHOPULMONARY DISEASES AND CORRECTION OF THEM WITH ANTIOXIDANT PREPARATIONS

Lyapina S.A.¹, Fedotova G.G.²

¹Mordovian State University named after N.P. Ogarev, Saransk, e-mail: dep-mail@adm.mrsu.ru;

²Mordovian State Pedagogical Institute named after M.E. Evsevjev, Saransk, e-mail: mgpi@moris.ru

The article is devoted to the study of the effect of antioxidant preparations on the intensity of mitochondrial fluorescence of the potential-sensitive cation probe 4- (*p*-dimethylaminostyryl) -1-methylpyridinium (DSM) and lipid peroxidation (POL) activity in cells with bronchopulmonary diseases. The peculiarities of the action of drugs (dimephosphon and mexidol) on neutrophils in the development of antioxidant stress are considered. The most effective means of having a positive effect on neutrophils is dimephosphon. The drug increases the overall antioxidant activity and significantly inhibits the intensity of lipid peroxidation, resulting in the regeneration of the cell membrane apparatus. It has been shown that mexidol is an inhibitor of free-radical reactions taking place in neutrophils, changes the structural and functional state of membranes, lipid-protein interrelations, receptor functions and membrane-bound enzymes. Both drugs are membrane modulators that alter the structural and functional properties of neutrophil membranes.

Keywords: neutrophils, bronchopulmonary diseases, antioxidant preparations, membrane, dimephosphon, mexidol, mitochondria, lipid peroxidation (POL).

Мембранодестабилизирующее действие эндотоксинов приводит к деструкции рецепторного аппарата, снижению микровязкости биомембран, нарушению внутриклеточного метаболизма, снижению энергетики в митохондриях за счет роста процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [5, с. 30].

Деструкция мембран играет ведущую роль в патогенезе бронхолегочных заболеваний, в связи с этим мы считаем необходимым использование в лечении бронхолегочных

заболеваний антиоксидантов или мембраностабилизаторов. Димефосфон обладает рядом свойств: противовоспалительным, мембраностабилизирующим, иммунокорригирующим, благодаря которым его применение при бронхолегочных заболеваниях патогенетически является обоснованным [2, с. 63]. Сочетание таких свойств димефосфона, как торможение процессов функциональной активности клеток за счет воздействия на кальций-зависимые пути передачи возбуждающего сигнала, подавление на ранних стадиях острого воспаления, лежит в основе применения препарата. Другой препарат – мексидол, обладает широким спектром действия и фармакологической активностью, эффективен при гипоксии. Он способен ингибировать свободнорадикальное окисление липидов биомембран, активно реагировать с перекисными радикалами липидов и гидроксильными радикалами пептидов и белков, повышать активность антиоксидантных ферментов, ответственных за образование и расходование перекисей липидов, а также активные формы кислорода. Мексидол является активным мембраномодулятором, способным изменять физико-химические и структурно-функциональные свойства мембран. Обладая липидрегулирующими свойствами, а именно способностью повышать содержание полярных фракций липидов, уменьшает содержание холестерина и липопротеинов низкой плотности. Мексидол увеличивает текучесть мембраны, улучшает энергетический обмен в клетке, а также обладает противогипоксическим действием [1].

Целью исследования явилось изучение структурно-функциональной организации мембран нейтрофилов при бронхолегочных заболеваниях и коррекция их димефосфоном и мексидолом.

Материалы и методы исследования

В модельных опытах *in vitro* исследовалось действие антиоксидантных препаратов. Флуоресцентными методами исследовались: трансмембранный потенциал, микровязкость и липид-белковые взаимодействия в плазматических мембранах с помощью флуоресцентного положительно заряженного зонда ДСМ – 4-(*p*-диметиламиностирил)-1-метилпиридиний-*p*-толуолсульфонат. Оценка митохондриальной активности клеток осуществлялась при помощи потенциалчувствительного зонда-катиона ДСМ. Хемилюминесцентным методом определялась интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантная активность (АОА) по методу Ю.А. Владимирова и М.Г. Шерстнева (1989).

Больные бронхолегочными заболеваниями были разделены на 3 группы: больные острой формой бронхита – 10 человек (I группа), больные пневмонией в период обострения – 10 человек (II группа), больные бронхиальной астмой (хроническая форма) – 10 человек (III группа).

В серии опытов *in vitro* (30 больных бронхолегочными заболеваниями) было изучено

влияние исследуемых препаратов – димефосфона и мексидола на перекисное окисление липидов в дозе, соответствующей концентрации препарата в крови больных, при которой они проявляют мембраностабилизирующее действие. Исследуемые препараты инкубировали с кровью больных людей бронхолегочными заболеваниями в объеме, не превышающем 3 мкл лекарственного препарата в 1 мл суспензии лейкоцитов в течение 30 мин при температуре 37 °С. Данная процедура относится к числу медикаментозных и проведена с согласия больных.

Результаты исследования и их обсуждение

В развитии хронических неспецифических заболеваний легких и переходе острых процессов в хронические защитную роль играют иммунные механизмы. Митохондрии со сниженным синтезом аденозинтрифосфата (АТФ) оказываются наиболее чувствительными к воздействию факторов, нарушающих дыхание, и поэтому быстрее разрушаются. В патогенезе острого и хронического бронхита, пневмонии и бронхиальной астмы немалое значение уделяют изменению фагоцитарной активности нейтрофилов, так как снижение их функциональной активности является главной причиной перехода острых процессов воспаления в бронхах в затяжную и хроническую форму.

В воспалительном процессе нейтрофилы выполняют как минимум две функции: во-первых, разрушают и удаляют вызвавшие воспаление агенты и поврежденные ткани, образующиеся в результате действия этих факторов; во-вторых, регулируют поведение клеток, участвующих в воспалении.

Нами обследована кровь больных бронхолегочными заболеваниями, инкубированная с лекарственными препаратами – димефосфоном и мексидолом. В нейтрофилах крови нами определены параметры жизнеспособности и интенсивности флуоресценции (ΔF_{mx}) ДСМ в митохондриях.

Согласно нашим данным, в крови больных, инкубированной димефосфоном, достоверно увеличивается показатель ΔF_{mx} : в I группе больных на 50,3%, во II группе – на 83,6%, в III группе – на 89,0%. После инкубации с димефосфоном интенсивность свечения митохондрий достоверно повышается, но снижается количество низкоэнергизированных нейтрофилов в группах больных по сравнению с фазой обострения. Терапия димефосфоном оказала заметное влияние на показатель ΔF_{mx} . При флуоресценции нейтрофилы, инкубированные с димефосфоном, у больных бронхолегочными заболеваниями отличаются от нейтрофилов больных до базовой терапии ярким свечением ДСМ в митохондриях, что говорит о стабилизации мембран митохондрий и восстановлении их трансмембранного потенциала в клетках, необходимого для синтеза АТФ. По-видимому, мембраностабилизирующее действие димефосфона связано с его влиянием на структурную

организацию мембран. Полученные данные свидетельствуют о повышении энергообеспечения нейтрофилов в крови больных бронхолегочными заболеваниями, о повышении жизнеспособности клеток, о росте их функциональной активности под влиянием димефосфона, а также о фагоцитарной реакции нейтрофилов.

В нейтрофилах под воздействием мексидола увеличивается интенсивность флуоресценции ДСМ в митохондриях: в I группе больных до 60,2%, во II группе – до 68,7%, в III группе – на 72,8%. Полученный результат дает основание для вывода, что способность мексидола повышать энергетический статус нейтрофильных клеток является особенностью опосредованно способствовать увеличению их функциональной активности. При бронхолегочной патологии определяется красная флуоресценция ядра с отсутствием желтой флуоресценции митохондрий. Основная часть интенсивности флуоресценции красителя ДСМ в клетке находится в митохондриях. В условиях гипоксии отмечается снижение интенсивности флуоресценции ДСМ, т.е. зонд проникает в цитоплазму и ядро. При этом видна красная флуоресценция ядра и наблюдается флуоресценция ДСМ, связанная с нуклеиновыми кислотами. Характерно, что это проявляется оранжево-красной флуоресценцией ядра с наличием зеленого ободка цитоплазмы и отсутствием желтой флуоресценции митохондрий.

Антиоксидантный эффект мексидола способствует положительному воздействию на структурно-функциональное состояние мембран, повышая фракции липидов – фосфатидилсерина и фосфатидилинозитола, снижая соотношение холестерина/фосфолипиды, благодаря чему он ингибирует процессы ПОЛ и оказывает модулирующее влияние на активность.

Инкубация крови больных бронхолегочными заболеваниями с мексидолом на основе базового лечения вызывает защитное действие препарата на нейтрофилы, так же как и димефосфона, с большим уменьшением средней интенсивности флуоресценции ДСМ, которая была выше, чем при базовой терапии. При изучении морфологии в нейтрофильных клетках визуализируется ярко-красная флуоресценция ядра с сохранением отдельных функционально активных митохондрий.

В патогенезе бронхолегочных заболеваний значительная роль отводится антиоксидантному стрессу, как фактору нарушения структурно-регуляторной функции клеток за счет метаболического повреждения липидного бислоя. Одновременно с усилением липопероксидации наблюдается деструкция белковых компонентов клеточных мембран.

При бронхолегочных заболеваниях эффективность лекарственных препаратов контролировалась по показателям ПОЛ. Отмечены заметные позитивные сдвиги в системе антиоксидантной защиты. Являясь неспецифическим проявлением метаболизма, перекисное

окисление липидов отчетливо изменяется под влиянием любого стрессорного воздействия.

У обследованных людей в стадии обострения интенсивность ПОЛ в сыворотке крови больных I группы увеличивается в 3,2 раза, II группы – в 3,7 раза, III группы – в 3,5 раза. Рост данного показателя сильнее выражен при пневмонии,

Кроме того, снижение уровня антиоксидантов в ответ на активацию ПОЛ при истощении резервных возможностей рассматривается как один из общих механизмов мембранного аппарата клеток.

Установлено, что процессы свободнорадикального окисления, изменяя структуру и фосфолипидный состав мембран клеток, приводят к искажению информации от внеклеточных регуляторов к внутриклеточным эффекторным системам, следствием чего является нарушение реактивности клеток.

В зависимости от характера проводимой терапии все обследованные больные получали базовое лечение и терапию димефосфоном и мексидолом. На фоне базовой терапии уровень процессов липопероксидации при бронхолегочных заболеваниях отмечается ниже контрольного показателя. Димефосфон и мексидол угнетают интенсивность ПОЛ в сыворотке крови больных I группы на 35,0% и 25,0%, II группы – на 42,0% и 23,0%, III группы – на 11,0% и 22,3% соответственно.

Введение димефосфона наиболее существенно препятствует инициативе свободнорадикальных процессов, особенно при бронхите и бронхиальной астме. Меньше выражено влияние при пневмонии. Возможно, в реализации эффекта димефосфона находится его способность нейтрализовать свободные радикалы. В связи с этим данный препарат существенно увеличивает общую антиоксидантную активность. Кроме того, димефосфон проявляет свойства прямого антиоксиданта за счет антирадикальных свойств и непрямого антиоксидантного действия, способного повышать активность ферментного звена.

Мексидол является ингибитором свободнорадикального окисления, уменьшающего ПОЛ и повышающего активность антиоксидантной системы. Препарат обладает мембранопротекторными свойствами в результате изменения вязкости липидного слоя, а также вследствие прямого встраивания в биомембраны. Он восстанавливает нарушенные функции клеточных мембран, оказывая моделирующее влияние на мембраносвязанные ферменты, ионные каналы, рецепторные комплексы.

С.В. Оковитый (2001) установил, что мексидол является антигипоксантом прямого энергизирующего действия. Он усиливает эндогенное дыхание в 3 раза, что сопровождается восстановлением флавопротеинов и появлением окислительного фосфорилирования в присутствии аденозиндифосфата, т.е. проявляет свойства дыхательной цепи, что

чрезвычайно важно для заболеваний, в генезе которых решающую роль играет гипоксия. Димефосфон оказывает влияние на активацию антиоксидантной системы, снижая ПОЛ, а мексидол, кроме снижения ПОЛ, в основном повышает энергетiku клетки [4, с. 76].

При анализе антиоксидантных свойств мексидола в опытах *in vitro* проявляется его влияние на процессы перекисного окисления липидов. Установлено, что процессы липопероксидации в сравнении с димефосфоном при применении мексидола значительно слабее. Показатели ПОЛ в сыворотке крови, инкубированной димефосфоном и мексидолом, у больных I группы составляет 70,0% и 44,6%, II группы – 55,0% и 41,2%, III группы – 64,0% и 49,8%.

Положительный эффект димефосфона по сравнению с базовой терапией, по-видимому, объясняется тем, что при базовом лечении применяется несколько лекарственных веществ, действующих на разные стороны метаболизма. Димефосфон, обладая антиоксидантным и иммуномодулирующим действием, по сочетанию положительных эффектов не имеет аналогов.

За счет своих многочисленных метильных групп димефосфон способен проникать в биологические мембраны и встраиваться в них, тем самым стабилизируя мембрану клетки. Мембраносвязывающие ферменты антиоксидантной защиты восстанавливают свою активность, ингибируя процессы ПОЛ. Ингибируя перекисное окисление липидов снимается процесс воспаления, тем самым препарат проявляет свое противовоспалительное действие. За счет реактивной способности метильные группировки могут обладать электрофильностью и нуклеофильностью. Группировки (CO) и эфирная связь (OCH₃) характеризуются донорными свойствами, поэтому димефосфон обладает антиоксидантной активностью.

Димефосфон и мексидол проявляют выраженное антиоксидантное действие, ингибируя ПОЛ в сыворотке крови, нейтрофилах, с наиболее выраженным эффектом у димефосфона. Эти препараты влияют на рецепторы мембран клеток, на состояние самих мембран и главное – могут рассматриваться как иммуномодуляторы и физиологические стимуляторы иммунитета [3, с. 905].

Активация ПОЛ, развивающаяся на фоне напряжения и истощения антиоксидантной системы, способствует развитию антиоксидантного стресса. При бронхолегочных заболеваниях применение димефосфона и мексидола активирует антиоксидантную систему. Нами показана возможность фармакологической коррекции ПОЛ в крови больных бронхолегочными заболеваниями. Накопление молекул средней массы приводит к усилению процессов ПОЛ и повышению уровня циркулирующих иммунных комплексов. Это влечет за собой нехватку кислорода. Применение лекарственных препаратов приводит к повышению антиоксидантной активности, аэробные процессы (сукцинатдегидрогеназа) усиливаются,

анаэробные (лактатдегидрогеназа) – замедляются. Функционирование антиоксидантной системы определяет развитие адаптационных и компенсаторных процессов и повышение к действию токсикантов.

Антиоксидантный стресс при бронхолегочных заболеваниях выражен неодинаково. При воспалении одна из основных причин деструкции тканей – гиперреактивность нейтрофилов. В связи с этим применение терапевтических препаратов должно быть направлено на нормализацию функций нейтрофилов. Основная масса нейтрофилов во всех трех группах больных приходится на пулы с низкой интенсивностью свечения митохондрий. У больных бронхолегочными заболеваниями в стадии обострения увеличивается количество нейтрофилов, способных к фагоцитозу вследствие изменений структурно-функциональной организации мембран митохондрий. Встречаются клетки с «оранжевой» флуоресценцией ядра и «слабо-желтой» флуоресценцией митохондрий. После лечения димефосфоном интенсивность свечения митохондрий достоверно повышается, количество низкоэнергизированных нейтрофилов снижается. Под воздействием мексидола средняя интенсивность флуоресценции также повышается. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении интенсивно флуоресцирующих функционально активных нейтрофильных клеток.

Преимущественная эффективность димефосфона связана с его вмешательством в начальные пусковые реакции воспалительного процесса.

Выводы

1. Димефосфон и мексидол, обладая антиоксидантной активностью, пролонгируют период функциональной активности нейтрофилов в условиях гипоксии *in vitro*. Клетки становятся более активными, что проявляется достоверным повышением нейтрофильной активности. Электронно-микроскопически это выражается в увеличении лизосомального аппарата и регенерацией митохондриальных крист. В ядре обнаруживается большое количество гетерохроматина.

2. Учитывая высокую клиническую эффективность димефосфона и мексидола, их можно рекомендовать для терапии бронхолегочных заболеваний. Применение данных препаратов в качестве лечебных средств основано на восполнении ущерба, связанного с развитием в организме гипоксии. Они сокращают сроки лечения, удлиняют период здоровья при хронической патологии, способствуют восстановлению активности клеток фагоцитарной системы.

Список литературы

1. Бурнашкина О.Н. Влияние мексидола на клинико-иммунологический статус пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / О.Н. Бурнашкина, Н.М. Селезнева, А.А. Котляров // Живые и биокосные системы. – 2015. – № 11 [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.jbks.ru/archive/issue-11/article-6>.
2. Визель А.А. Диметилхлоробутилфосфонилдемитилат (димефосфон): применение в пульмонологии и фтизиатрии / А.А. Визель, А.О. Визель, Л.И. Щукина // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2013. – № 3. – С. 63–65.
3. Горошко О.А. Клинико-фармакологические аспекты применения антиоксидантных лекарственных средств / О.А. Горошко, В.Г. Кукес, А.Б. Прокофьев // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 4-5. – С. 905–912.
4. Оковитый С.В. Антигипоксанты / С.В. Оковитый, А.В. Смирнов // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2001. – Т. 64. – № 3. – С. 76–80.
5. Федотова Г.Г. Морфофункциональное исследование нейтрофилов в условиях эндотоксикоза: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Саранск, 2007. – 38 с.