

*На правах рукописи*

**Бельских Эдуард Сергеевич**

**КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА РОЛИ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ОБОСТРЕНИИ  
ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ**

14.01.04 – Внутренние болезни

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор **Урясьев Олег Михайлович**

**Научный консультант:**

кандидат биологических наук, доцент **Звягина Валентина Ивановна**

**Официальные оппоненты:**

**Трофимов Василий Иванович**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой терапии госпитальной с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого с клиникой

**Будневский Андрей Валериевич**, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой факультетской терапии

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «    » 2019 года в «    » часов на заседании диссертационного совета Д 208.084.04 при ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, адрес организации: 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34) и на сайте [www.rzgmu.ru](http://www.rzgmu.ru).

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук, доцент

Песков О.Д.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

Рост заболеваемости хронической обструктивной болезнью легких, гетерогенность проявлений ХОБЛ, отсутствие высокоэффективных методов терапии ХОБЛ, позволяющих остановить прогрессирующее снижение функции легких в долгосрочной перспективе, обуславливают актуальность изучения патогенетических аспектов заболевания, которые могут быть использованы для персонализированного подхода и оптимизации терапии ХОБЛ (Agusti A. et al., 2017).

Результаты исследований, полученные на животных моделях и клеточных культурах, демонстрируют тесную взаимосвязь между функционированием митохондрий клеток различных тканей и основными патогенетическими механизмами ХОБЛ, а также потенциальную пользу от коррекции нарушения функций митохондрий (Wiegman C.H. et al., 2015; Agrawal A., Mabalirajan U., 2016). По мнению ряда исследователей выраженность митохондриальной дисфункции клеток периферической крови можно рассматривать как возможный предиктор адаптивных реакций всего организма (Garrabou G. et al., 2016; Jang D.H. et al., 2017). В связи с этим представляется целесообразным изучение степени выраженности митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови и её взаимосвязи с нарушением функции легких у больных ХОБЛ с различными клиническими фенотипами. Полученные данные помогут существенно расширить представления о патогенезе заболевания, что может стать основой для выявления новых потенциальных биомаркеров и терапевтических мишеней, которые будут использованы для уточнения прогноза и подбора индивидуализированной терапии.

### **Цель исследования**

Дать характеристику вторичной митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови и оценить её взаимосвязь с основными клиничко-функциональными показателями больных с обострением хронической обструктивной болезни легких.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать функционирование митохондрий моноядерных лейкоцитов у больных с обострением хронической обструктивной болезни легких.
2. Оценить взаимосвязь степени выраженности митохондриальной дисфункции с основными клинико-функциональными показателями больных с обострением хронической обструктивной болезни легких.
3. Выявить особенности маркеров митохондриальной дисфункции у больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями.
4. Определить значение отказа от курения для митохондриальных нарушений моноядерных лейкоцитов крови у больных при обострении ХОБЛ.

### **Научная новизна**

Впервые:

1. оценено значение митохондриального мембранного потенциала моноядерных лейкоцитов крови методом проточной цитофлуометрии с использованием катионного красителя JC-1 у больных при обострении ХОБЛ;
2. исследована взаимосвязь показателей митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови и показателей функции легких у больных с ХОБЛ в зависимости от степени тяжести заболевания;
3. проведена комплексная оценка окислительной модификации белков мононуклеарных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ различной степени тяжести и различных групп риска;
4. исследованы показатели сукцинат-опосредованного механизма быстрой адаптации митохондрий к гипоксии моноядерных лейкоцитов крови у больных ХОБЛ различной степени тяжести и различных групп риска;
5. исследовано значение отказа от курения для функционирования митохондрий моноядерных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ.

### **Теоретическая значимость работы**

Полученные результаты дополняют представление о роли вторичной митохондриальной дисфункции и сукцинат-опосредованном механизме быстрой адаптации митохондрий к гипоксии при различных клинико-

функциональных особенностях у больных ХОБЛ с обострением заболевания. Полученные результаты могут стать основой для дальнейших исследований, посвящённых выявлению эндотипов хронической обструктивной болезни легких различающихся возможностями адаптации к острой и хронической дыхательной недостаточности, а так же послужить начальным этапом для выделения маркера - критерия эффективности митохондриально-ориентированной терапии ХОБЛ и других хронических воспалительных заболеваний связанных с вторичной митохондриальной дисфункцией.

### **Практическая значимость работы**

Результаты исследования позволили выявить изменение показателя мембранного потенциала мононуклеарных лейкоцитов крови как маркера системной митохондриальной дисфункции при ХОБЛ. Выявленные корреляционные связи маркеров окислительной деструкции белков мононуклеарных лейкоцитов с клиническими характеристиками больных с ХОБЛ создают предпосылки для разработки методов направленных на раннюю диагностику больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями. Полученные сведения о связи активности сукцинатдегидрогеназы и концентрации уровня сукцината с уровнем симптомов у больных ХОБЛ могут быть использованы для оценки возможностей адаптации пациентов к развитию гипоксемии и дыхательной недостаточности.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов исследования основана на достаточном объеме исследуемых групп, строгом соблюдении применяемых в работе методик исследования, корректном использовании методов статистического анализа, а также логическом обосновании результатов работы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Обострение ХОБЛ сопровождается развитием системной вторичной митохондриальной дисфункцией, которая может быть определена по снижению мембранного потенциала митохондрий моноядерных лейкоцитов крови.

2. Клинико-функциональные нарушения при обострении ХОБЛ связаны с выраженностью системной митохондриальной дисфункции. Высокие показатели концентрации сукцината и активности сукцинатдегидрогеназы характерны для больных с малым количеством симптомов, наибольшее снижение мембранного потенциала и наивысший уровень маркеров окислительного стресса наблюдается у больных с тяжелой дыхательной недостаточностью, уменьшение показателя резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков связано с частыми обострениями заболевания в анамнезе.

3. Больные с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями характеризуются значительным снижением резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков. Больные с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями с небольшим количеством симптомов отличаются большими показателями сукцинат-опосредованного механизма адаптации митохондрий моноядерных лейкоцитов к гипоксии.

4. Отказ от курения у больных с обострением ХОБЛ ассоциирован с менее выраженной митохондриальной дисфункцией и снижением интенсивности окислительного повреждения белков моноядерных лейкоцитов крови. При этом сниженный уровень мембранного потенциала митохондрий и неэффективность антиоксидантной защиты у экс-курильщиков подтверждает значение вторичной митохондриальной дисфункции как потенциальной терапевтической мишени при ХОБЛ.

### **Внедрение результатов в практику**

Результаты работы внедрены в лечебно-диагностический процесс пульмонологического отделения ГБУ РО «Областная клиническая больница», НКЦ ГОИ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, внедрены в учебный процесс кафедры факультетской терапии с курсом терапии ФДПО и кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

## **Апробация работы**

Основные положения диссертации представлены на: IV Межрегиональной конференции кардиологов и терапевтов (Рязань, 2018), XIII Национальном конгрессе терапевтов (Москва, 2018), IV Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2018), 11-й Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (Астрахань, 2018), XXIV ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины - 2018» (Санкт-Петербург, 2018), X Юбилейной Российской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье человека в XXI веке» (Казань, 2018).

## **Объём и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 141 страницах машинописного текста, иллюстрирована 29 таблицами и 10 рисунками. Состоит из введения, 4 глав, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 237 источников, в том числе 37 отечественных и 200 зарубежных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В исследование были включены 107 субъектов, разделенные на 3 группы: госпитализированные по поводу обострения больные с ХОБЛ для стационарного лечения в пульмонологическом отделении Государственное бюджетное учреждение Рязанской области «Областная клиническая больница», с 2017 по 2018 годы с верифицированным диагнозом хроническая обструктивная болезнь легких, 58 человек; обратившиеся по поводу обострения хронического бронхита в ГБУ поликлинику № 6, с 2017 по 2018 гг., с верифицированным диагнозом хронический бронхит, 24 человека; здоровые добровольцы, 25 человек.

Исследования было одобрено Локальным Этическим Комитетом ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (протокол №2 от 7.10.2016 года), выполнено в соответствии с требованиями Национального стандарта Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика - Good Clinical Practice (GCP) ГОСТ Р 52379-2005» и Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2008 года.

Основанием для включения в исследование служило подписанное информационное согласие. Критериями включения в исследования для группы больных ХОБЛ служили: возраст от 40 до 80 лет, исходный постбронходилатационный показателем  $ОФВ_1/ФЖЕЛ \leq 0,7$ . Критериями включения в исследования для группы больных хроническим бронхитом являлись возраст от 40 до 80 лет, наличие хронического бронхита в анамнезе более 2х лет; для группы здоровых добровольцев: возраст от 40 до 80 лет, отсутствие задокументированных хронических заболеваний легких и сердечно-сосудистой системы в анамнезе.

Критерии исключения из исследования для всех групп были хирургические вмешательства на легких в анамнезе, наличие в анамнезе злоупотребления алкоголем и наркотическими веществами, психических расстройств, пациенты с легочными заболеваниями отличными от ХОБЛ и хронического бронхита, наличие диагностированной ишемической болезни сердца в виде стенокардии напряжения, перенесенных инфарктов миокарда, нарушений ритма, хронической сердечной недостаточности, гипертоническая болезнь 3 стадии, острые воспалительные и хронические заболеваний в фазе обострения и неполной ремиссии, сахарный диабет 1–го и 2 –го типа, онкологические заболевания и болезни крови, моноцитоз в результатах общего анализа крови, определяемый как содержание моноцитов  $\geq 11\%$  от общего числа лейкоцитов, беременность и период лактации.

Диагноз ХОБЛ, оценка степени выраженности бронхообструкции и группы риска устанавливались на основании клинико-анамнестических данных,



объективного обследования пациента, данных спирометрии в соответствии с критериями GOLD, пересмотра 2017 года.

Общая характеристика исследуемых групп представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Клинико-функциональные характеристики исследуемых групп

Показатель	ХОБЛ, n=58 (1)	Хронический бронхит, n=24 (2)	Здоровые добровольцы, n=25 (3)
Возраст, лет	67[61;71]	64[54;68]	61[54;64]
Курение:			
курильщики	34	24	0
экс-курильщики	24	0	0
не курившие ранее	0	0	25
Индекс пачко-лет:			
Всей группы	25[20;30]	15[10;20]*	-
Курильщиков	25[20;30]	15[10;20]*	-
Экс-курильщиков	25[15;30]	-	-
Группы ХОБЛ по ОФВ <sub>1</sub> :			
ХОБЛ2	27	-	
ХОБЛ3	31	-	
ОФВ <sub>1</sub> , %	48[38;61]	92[89;94]*	93[92;95]**
Результаты комплексной оценки ХОБЛ:			
В	18	-	
С	20	-	
Д	20	-	
SpO <sub>2</sub> , %	92[89;93]	97[96;98]*	97[97;98]**
Гипертоническая болезнь:			
есть	39	0	0
отсутствует	19	24	25

\* -  $p_{1-2} < 0,05$ ; \*\* -  $p_{1-3} < 0,05$

Отличия в возрасте исследуемых групп больных носили статистически незначимый характер ( $p > 0,05$ ), в связи с чем влияние возраста на показатели функции легких в сравниваемых группах рассматривали как сопоставимое. Все больные ХОБЛ были либо активными курильщиками (58,6%), либо курили ранее (41,4%). Экс-курильщики как с ХОБЛ, так и с хроническим бронхитом имели в анамнезе срок отказа от курения минимум 1 год.

Сопутствующие заболевания в виде установленного диагноза гипертонической болезни 2 стадии имели 39 больных. Все больные с гипертонической болезнью получали регулярную монотерапию препаратом из группы ингибиторов ангиотензин превращающего фермента (лизиноприл) которые были сопоставимы по дозе (10 мг), кратности приема (1 раз в день) и показателям фармакокинетики.

Таблица 2 - Клинико-функциональные и демографические характеристики исследуемых групп больных ХОБЛ

Показатель	ХОБЛ 2, n=27 (1)	ХОБЛ 3, n=31 (2)
Возраст, лет	67[53;71] $p_{1-2}=0,79$	67[62;70]
Результаты комплексной оценки ХОБЛ:		
В	9	9
С	11	9
Д	7	13
Фенотип ХОБЛ с частыми обострениями:	18	21
Индекс пачко-лет	25[10;30] $p_{1-2}=0,62;$	25[20;30]
ОФВ <sub>1</sub> , %	62[58;68] $p_{1-2}<0,0001;$	40[35;43]
SpO <sub>2</sub> , %	93[91;93] $p_{1-2}=0,0078;$	91[88;92]
Сопутствующая патология		
Наличие гипертонической болезни	18	21
Структура терапии больных с ХОБЛ		
Прием ДДХЛ	27	31
Прием ДДБА	11	18

Для оценки взаимосвязи выраженности митохондриальной дисфункции и функциональных нарушений при ХОБЛ больные основной группы были разделены на 2 подгруппы в соответствии с показателем ОФВ<sub>1</sub> по классификации степени тяжести GOLD. Группы больных ХОБЛ, разделенные в соответствии с выраженностью бронхообструкции, были сопоставимы по возрасту и стажу курения (таблица 2).

Для исследования связей между показателями функционирования митохондрий и клиническими характеристиками, такими как выраженность

симптомов и частота обострений заболевания, была проведена оценка с использованием опросников (mMRC и CAT) и учетом частоты обострений в анамнезе. По результатам комплексной оценки симптомов и риска обострений исследуемые больные были разделены на группы В, С и D. Полученные группы больных были сопоставимы по индексу пачко-лет, выраженности бронхообструкции и уровню SpO<sub>2</sub>.

Определение митохондриального мембранного потенциала проводилось у 34 исследуемых, характеристика которых приведена в таблице 3. Больные в группе сравнения и в контрольной группе, представленной здоровыми некурящими добровольцами, были сопоставимы по возрасту.

Таблица 3 - Клинико-функциональные характеристики групп исследуемых, которым проводилось определение мембранного потенциала митохондрий методом проточной цитофлуориметрии

Показатель	Контроль, n=8 (группа 1)	ХОБЛ 2, n=12 (группа 2)	ХОБЛ 3, n=14 (группа 3)
Возраст, М±s лет	57,25±9,32	66,8±11,8	61,3±10,23
ОФВ <sub>1</sub> , Ме[Q1;Q3] %	92[91;93,5] p <sub>1-2</sub> =0,0002 p <sub>1-3</sub> =0,00013	59,5[54;66] p <sub>2-3</sub> =0,00012	43,4[41;47]
Курение:			
курильщики	0	4	8
экс-курильщики	0	8	6
не курившие	8	0	0
ИПЛ, Ме[Q1;Q3], пачко-лет	0	25[20;30]	25[25;33.75]
SpO <sub>2</sub> , Ме[Q1;Q3] %	97[97;98] p <sub>1-2</sub> =0,0009 p <sub>1-3</sub> =0,0002	93[91,5;93,5] p <sub>2-3</sub> =0,0086	88,5[87;92]

Среди больных с ХОБЛ был снижен показатель SpO<sub>2</sub>. При этом данный показатель имел наименьшие значения в группе больных с тяжелой ХОБЛ.

Исследуемые группы больных В, С и D, были сопоставимы по возрасту, стажу курения, показателю ОФВ<sub>1</sub>. Больные группы D (87[86;89]) отличались статистически значимым снижением показателя SpO<sub>2</sub> по сравнению с группами В (92[91;93]) и С (93[92;94]), что отражало более выраженную гипоксемию.

## **Характеристика клинических и лабораторных методов исследования**

Всем пациентам были проведены общеклиническое обследование и оценка функции внешнего дыхания методом спирометрии, выполнены биохимические исследования уровня окислительной модификации белков, активности супероксиддисмутазы (СОД) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ), концентрации сукцината, уровня мембранного потенциала митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови. Обследование и забор крови проводились на второй день госпитализации в утренние часы.

Исследование функции внешнего дыхания проводилось с помощью спирографа MicroLab (Micro Medical, Великобритания). Определение сатурации кислорода в крови ( $SpO_2$ ) проводилось с помощью пульсоксиметра SpirotelSpO2 (MIR, Италия).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов крови для исследования биохимических показателей оксидативного стресса и адаптации к гипоксии и мембранного потенциала митохондрий проводилось путем центрифугирования с помощью пробирок BD CPT, содержащих разделительный гель, раствор фиколла для создания градиента плотности, гепарин натрия (BD Vacutainer CPT, США).

Для исследования активности СДГ, СОД, концентрации сукцината и уровня окислительной модификации в моноядерных лейкоцитах готовили суспензию клеток с добавлением детергента Triton X-100 с подсчетом количества клеток в 1 мл суспензии. До проведения исследований суспензию замораживали. После разморозки суспензию однократно использовали для определения показателей с последующим пересчетом результатов на  $10^6$  клеток в 1 мл суспензии.

Определение сукцинатдегидрогеназы (СДГ) проводили с помощью реакции восстановления красной кровяной соли ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) в ферроцианид калия ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), что сопровождалось пропорциональным снижением оптической плотности раствора при длине волны 420 нм. Измерения проводили

с использованием КФК 3-01-«ЗОМЗ» (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Концентрацию янтарной кислоты определяли с помощью набора Succinate Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich, США) спектрофотометрически на анализаторе StatFax 3200 (AWARENESS Technology Inc. США). Измерения проводили при длине волны 450 нм.

Определение активности супероксиддисмутазы проводили с использованием метода, основанного на торможении реакции аутоокисления кверцетина в присутствии СОД, которая нейтрализует супероксиданионы образующиеся в аэробных условиях при pH=10 и присутствии ТЕМЕД, что сопровождается замедлением снижения оптической плотности при  $\lambda=406$  нм. Измерения проводили на КФК 3-01-«ЗОМЗ» (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия).

Комплексную оценку окислительной посттрансляционной модификации белков проводили путем определения уровня карбонильных аддуктов белков по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином. Для образующихся при этом ДНФГ-аддуктов характерны специфические спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой части. Измерение содержания карбонильных аддуктов проводили на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ Спектр», Россия). Количество карбонильных производных аминокислотных остатков в белках оценивали по площади под кривой спектра поглощения.

Для исследования мембранного потенциала митохондрий моноядерные клетки выделяли путем центрифугирования в пробирках с разделительным гелем (BD Vacutainer СРТ, США). Полученные клетки подсчитывали на гемоцитометре SysmexХТ-2000i (Япония) и обрабатывали с использованием набора MitoProbe™ JC-1 Assay Kit («Molecular Probes», США). Проточную цитофлуориметрии осуществляли на цитометре Cytomics FC 500 (США) с использованием программного обеспечения СХР.

Статистическую обработку результатов с помощью программы StatSoft Statistica 10.0. Для оценки нормальности распределения в группах размером

менее 50 использовали критерий Шапиро-Уилка, в группах с размером более 50 – критерий Колмогорова-Смирнова. При ненормальном распределении показатель характеризовали с помощью медианы (Me), первого и третьего квартиля (Q1 и Q3). При нормальном распределении величин группы описывали с использованием среднего значения (M) и стандартного отклонения (s). Гипотеза о равенстве дисперсий в выборках проверяли с помощью теста Левена. Анализа статистической значимости различий независимых выборок по количественному признаку при ненормальном распределении для 2-х групп проводили с использованием критерия Манна-Уитни, для множественных сравнений использовали критерий Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. При нормальном распределении и отсутствии различий дисперсий использовался однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений, для сравнения 2-х групп - критерий Стьюдента. Анализ корреляционных взаимосвязей осуществлялся с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена, когда распределение отличалось от нормального. Статистически значимыми считали различия при вероятности нулевой гипотезы об отсутствии различий  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Изменение показателей митохондриальной функции моноклеарных лейкоцитов у больных ХОБЛ**

Сравнение величины митохондриального мембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) моноядерных лейкоцитов периферической крови больных с ХОБЛ по сравнению с группой здоровых добровольцев позволило выявить снижение  $\Delta\psi$  митохондрий в лейкоцитах в целом (на 31%,  $p < 0,0001$ ) и в популяции лимфоцитов (на 29%,  $p = 0,0008$ ), что указывало на наличие вторичной митохондриальной дисфункции лейкоцитов при обострении ХОБЛ.

Исследование других показателей функционирования митохондрий на большей выборке, как следует из результатов, представленных в таблице 4,

подтвердило развитие вторичной митохондриальной дисфункции лейкоцитов при обострении ХОБЛ.

Снижение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков и многократный прирост окисленно-модифицированных белков, демонстрировали повреждение клеток периферической крови в условиях гипоксемии при обострении ХОБЛ.

Таблица 4 – Исследуемые показатели функционирования митохондрий моноядерных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ и в группах сравнения

Исследуемые показатели	ХОБЛ, n=58 (1)	Хр. Бронхит, n=24 (2)	Здоровые добровольцы n=25 (3)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин* 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	34[19;56] ; ↓ <sub>1-2</sub> в 3 раза, p <sub>1-2</sub> <0,0001 ↓ <sub>1-3</sub> в 2,74 раз, p <sub>1-3</sub> <0,0001	102[82;125],	93[87;98]
Концентрация сукцината, нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	319[215;407] ↓ <sub>1-2</sub> в 2,32 раз, p <sub>1-2</sub> <0,0001; ↓ <sub>1-3</sub> в 2,33 раз, p <sub>1-3</sub> <0,0001	739[664;863];	743[689;786]
Активность СОД, УЕ/ 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	28[13;42] ↓ <sub>1-2</sub> в 2,86 раз, p <sub>1-2</sub> <0,0001 ↓ <sub>1-3</sub> в 2,5 раз, p <sub>1-3</sub> <0,0001	80[74;85];	72[64;82]
СП ОМБ общая, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	242[165;333] ↑ <sub>1-2</sub> в 5 раз, p <sub>1-2</sub> <0,0001 ↑ <sub>1-3</sub> в 4,84 раз, p <sub>1-3</sub> <0,0001	48[37;78];	50[34;91]
РАП ОМБ, %	42[19;65] , ↓ <sub>1-2</sub> в 1,8 раз, p <sub>1-2</sub> =0,00002 ↓ <sub>1-3</sub> в 1,83 раз, p <sub>1-3</sub> =0,00002	76[65;87];	77[66;85]

Таким образом, обострение ХОБЛ сопровождается развитием вторичной митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов, что подтверждается резким увеличением уровня окислительной посттрансляционной модификации белков с сопутствующим значительным снижением резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации и обусловлено, вероятно, срывом механизмов быстрой адаптации к гипоксии и неэффективностью антиоксидантной защиты.

## Оценка взаимосвязи нарушений функционирования митохондрий моноядерных лейкоцитов у больных ХОБЛ с выраженностью bronхообструкции

Для определения роли бронхообструктивных нарушений в развитии системной вторичной системной митохондриальной дисфункции в патогенезе обострения ХОБЛ, были исследованы связи исследуемых показателей моноядерных лейкоцитов с выраженностью обструкции, гипоксемии и стажем курения. Сравниваемые группы были сопоставимы по возрасту, сопутствующей патологии и объему проводимой терапии.

Была выявлена положительная сильная взаимосвязь между  $SpO_2$  ( $R=0,7871$ ;  $p<0,05$ ) и мембранным потенциалом митохондрий лимфоцитов, при этом связь между  $ОФВ_1$  ( $R=0,6888$ ;  $p<0,05$ ) и мембранным потенциалом митохондрий лимфоцитов была выражена слабее.

Сильные положительные связи между исследуемыми клинико-функциональными показателями ХОБЛ и активностью СОД, СДГ, концентрацией внутриклеточного сукцината, как следует из таблицы 5, дают основания предполагать, что выраженность митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов обусловлена срывом адаптационных процессов митохондрий к гипоксемии в условиях обострения ХОБЛ, сопровождающегося нарастанием обструктивной дыхательной недостаточности.

Таблица 5 - Корреляционный анализ связей между основными объективными клинико-функциональными показателями ХОБЛ и маркерами митохондриальной дисфункции

Ранговые корреляции Спирмена R, $p<0,05$	$ОФВ_1$ , %	$SpO_2$ , %	ИПЛ
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин* $10^6$ клеток 1 мл суспензии	0,74	0,78	-0,54
Концентрация сукцината, нмоль на / $10^6$ клеток 1 мл суспензии	0,76	0,77	-0,59
Активность СОД, УЕ/ $10^6$ клеток 1 мл суспензии	0,75	0,76	-0,52
СП ОМБ общая, у.е./ на $10^6$ клеток 1 мл суспензии	-0,69	-0,69	0,52
РАП ОМБ, %	0,49	0,46	-0,32



Умеренные отрицательные связи между СП ОМБ и показателями ОФВ<sub>1</sub> и SpO<sub>2</sub> указывают, возможно, что степень окислительного повреждения связана не только с выраженностью гипоксемии.

Стаж курения, определяемый по индексу пачко-лет, характеризовался умеренной отрицательной связью, как с показателями ферментов и концентрацией сукцината, так и с уровнем СП ОМБ, при этом связь с РАП ОМБ была наименее слабой.

### **Изменение выраженности митохондриальной дисфункции у больных ХОБЛ в зависимости от выраженности симптомов и частоты обострений**

Больные с обострением ХОБЛ, различавшиеся выраженностью симптомов и частотой обострений, приводивших к обращению за медицинской помощью в анамнезе, характеризовались различной выраженностью нарушений функций митохондрий моноядерных лейкоцитов (таблица 6).

Было выявлено, что больные группы D, характеризовавшейся наиболее выраженной гипоксемией отличались значительным снижением Δψ лейкоцитов и лимфоцитов и наибольшим уровнем СП ОМБ. Наряду с этим больных групп С и D отличал статистически значимо сниженный уровень резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации

Таблица 6 - Исследование мембранного потенциала мононуклеарных лейкоцитов крови больных ХОБЛ, выделенных в зависимости от выраженности симптомов и частоты обострений

Показатели	Группы		
	ХОБЛ, В (1) n=11	ХОБЛ, С (2) n=7	ХОБЛ, D (3) n=8
Δψ, лейкоциты (регион G)	0,196[0,152;0,213] ↓ <sub>1-3</sub> в 1,42 раз, p <sub>1-3</sub> =0,0164	0,193[0,189;0,207] ↓ <sub>2-3</sub> в 1,39 раз, p <sub>2-3</sub> =0,008	0,138[0,124;0,146]
Δψ, лимфоциты (регион E)	0,216[0,157;0,236] ↓ <sub>1-3</sub> в 1,59 раз, p <sub>1-3</sub> =0,0164	0,203[0,200;0,222] ↓ <sub>2-3</sub> в 1,49 раз, P <sub>2-3</sub> =0,01	0,136[0,105;0,141]

При исследовании показателей функционирования митохондрий на большей выборке было установлено, что больные группы С, отличавшиеся наименьшим уровнем симптомов, имели больший уровень показателей

быстрого сукцинат-зависимого механизма адаптации митохондрий к гипоксии (таблица 7).

Больные группы D с частыми обострениями в анамнезе и наиболее выраженными симптомами демонстрировали наиболее выраженное снижение митохондриального потенциала митохондрий мононуклеаров крови, что сопровождалось наиболее интенсивным окислительным стрессом. При этом больных групп С и D объединял сниженный показатель РАП ОМБ исследуемых моноядерных лейкоцитов, что отражало, вероятно, повторяющиеся эпизоды гипоксемии, которые сопровождались развитием выраженного окислительного стресса.

Таблица 7 - Активность СДГ и концентрация сукцината в мононуклеарных лейкоцитах крови больных ХОБЛ, разделенных в зависимости от уровня симптомов и частоты обострений

Исследуемые показатели	ХОБЛ, В (1) n=18	ХОБЛ, С (2) n=20	ХОБЛ, D (3) n=20
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин* 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	34[25;48] ↓ <sub>1-2</sub> в 1,88 раз, p <sub>1-2</sub> =0,0015 ↑ <sub>1-3</sub> в 2,26 раз, p <sub>1-3</sub> =0,0019	64[56;73] ↑ <sub>2-3</sub> в 1,53 раз, p <sub>2-3</sub> <0,0001	15[11;20]
Концентрация сукцината, нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	299[216;365] ↓ <sub>1-2</sub> в 1,43 раз p <sub>1-2</sub> =0,002	428[357;545] ↑ <sub>2-3</sub> в 2,04 раз, p <sub>2-3</sub> <0,0001	208[157;276]
Активность СОД, УЕ/ 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	27[21;34]; ↓ <sub>1-2</sub> в 1,67 раз, p <sub>1-2</sub> =0,0032 ↑ <sub>1-3</sub> в 2,7 раз p <sub>1-3</sub> <0,0001	45[41;56] ↓ <sub>2-3</sub> в 1,43 раз, p <sub>2-3</sub> <0,0001	10[7;15]
СП ОМБ общая, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	237[211;361]; ↓ <sub>1-2</sub> в 1,54 раз, p <sub>1-2</sub> =0,038	154[126;223] ↓ <sub>2-3</sub> в 2,16 раз, p <sub>2-3</sub> <0,0001	333[267;500]
РАП ОМБ, %	68[64;80]; ↓ <sub>1-2</sub> в 2,83 раз, p <sub>1-2</sub> =0,0001 ↓ <sub>1-3</sub> в 2,34 раз, p <sub>1-3</sub> =0,001	24[15;46]	29[14;47]

## **Изучение особенностей маркеров митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови при обострении ХОБЛ у больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями**

Изучение особенностей маркеров митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови у больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями продемонстрировало, что частые обострения связаны со снижением уровня резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков (таблица 8). Уровень спонтанной окислительной модификации белков, показателей механизмов быстрой адаптации митохондрий к гипоксии в моноядерных лейкоцитах у больных с фенотипом с частыми обострениями ХОБЛ был сопоставим с показателями больных, не имеющих данного фенотипа.

Таблица 8 – Уровень РАП ОМБ моноядерных лейкоцитов исследуемых групп

Исследуемые показатели	ХОБЛ с частыми обострениями, n=18 (1)	ХОБЛ без частых обострений, n=40 (2)	Хронический бронхит n=24 (3)	Здоровые добровольцы n=25 (4)
РАП ОМБ, %	27[15;47]	68[64;80] p <sub>1-2</sub> <0,0001	76[65;87] p <sub>1-3</sub> <0,0001	77[66;85] p <sub>1-4</sub> =0,0002

Сопоставимость больных с фенотипом и без фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями по показателям активности СДГ и концентрации сукцината объясняется неоднородностью больных, выделенных только по истории частых обострений, включающих как больных группы С, так и больных группы D.

## **Определение значения отказа от курения для митохондриальных нарушений моноядерных лейкоцитов крови у больных при обострении ХОБЛ**

Исследование мембранного потенциала мононуклеаров крови методом проточной цитометрии позволило продемонстрировать положительное влияние отказа от курения на выраженность митохондриальной дисфункции, что отражалось в большем уровне  $\Delta\psi$  лейкоцитов и  $\Delta\psi$  лимфоцитов ХОБЛ экс-курильщиков по сравнению с аналогичными показателями курильщиков.

Важно отметить, что у экс-курильщиков уровень  $\Delta\psi$  лейкоцитов и лимфоцитов оставался статистически значимо меньшим по сравнению с контрольной группой, что сопровождалось соответствующим изменением маркеров окислительного стресса – меньший уровень СП ОМБ у экс-курильщиков по сравнению с курильщиками (таблица 9).

Изучение показателей функционирования митохондрий на более крупной выборке позволило выявить положительное влияние отказа от курения на уровень активностей СДГ ( $\uparrow$  в 1,4 раз,  $p=0,028$ ) и СОД ( $\uparrow$  в 1,7 раз,  $p=0,003$ ) моноядерных лейкоцитов крови. При этом показатели окислительного стресса и концентрации сукцината были сопоставимы в сравниваемых группах.

Таблица 9 - Сравнение показателей мембранного потенциала митохондрий мононуклеаров крови у курильщиков и экс-курильщиков с обострением ХОБЛ

Показатели	Группы		
	Контроль, n=8 (1)	ХОБЛ курящие, n=13 (2)	ХОБЛ экс-курильщики, n=13 (3)
$\Delta\psi$ , лейкоциты (регион G)	0,24±0,028	0,146±0,037 $\downarrow_{1-2}$ на 39,2%*	0,20±0,0284 $\downarrow_{1-3}$ на 16%, $p_{1-3}= 0,000743$ $\uparrow_{2-3}$ на 37% $p_{2-3}=0,000674$
$\Delta\psi$ , лимфоциты (регион E)	0,254±0,028	0,146±0,048 $\downarrow_{1-2}$ на 42,5%*	0,218±0,0357 $\downarrow_{1-3}$ на 14,2% $p_{1-3}=0,026246$ $\uparrow_{2-3}$ на 49% $p_{2-3}=0,000559$

В этих условиях низкий РАП ОМБ моноядерных лейкоцитов у экс-курильщиков демонстрирует недостаточный уровень антиоксидантной защиты, что подтверждает значение митохондриальной дисфункции как потенциальной терапевтической мишени при ХОБЛ.

## ВЫВОДЫ

1. Обострение хронической обструктивной болезни легких сопровождается развитием системной вторичной митохондриальной дисфункции, что выражается в снижении мембранного потенциала

митохондрий, увеличении уровня окислительной модификации белков, снижении активности СОД и резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации, а так же сопряжено с нарушением механизмов быстрой адаптации к гипоксии в моноядерных лейкоцитах крови.

2. Выраженность показателей митохондриальной дисфункции связана с выраженностью клинико-функциональных нарушений при ХОБЛ. Высокие показатели быстрой адаптации митохондрий к гипоксии характерны для больных с малым количеством симптомов, сниженный мембранный потенциал митохондрий и высокий уровень маркеров окислительного стресса наблюдается у больных с тяжелой дыхательной недостаточностью, уменьшение показателя резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков связано с частыми обострениями заболевания в анамнезе.

3. Больные с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями характеризуются значительным снижением уровня резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков моноядерных лейкоцитов крови. Больные с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями с небольшим количеством симптомов отличаются большей концентрацией внутриклеточного сукцината и активностью сукцинатдегидрогеназы моноядерных лейкоцитов крови.

4. Отказ от курения ассоциирован с частичным уменьшением выраженности митохондриальной дисфункции при обострении ХОБЛ, что подтверждает значение вторичной митохондриальной дисфункции как потенциальной самостоятельной терапевтической мишени при ХОБЛ.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Исследование резервно-адаптационного потенциала моноядерных лейкоцитов может быть рекомендовано как дополнительный диагностический критерий фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями.

2. Исследование концентрации сукцината и активности СДГ моноядерных лейкоцитов может быть использовано для оценки адаптации больных ХОБЛ к острой гипоксемии при обострении заболевания.

3. Исследование мембранного потенциала митохондрий методом проточной цитофлуориметрии с помощью катионного красителя JC-1 и выделения популяции лимфоцитов с использованием меченных флуорохромом антител к мембранному белку CD45 может быть использовано для подтверждения системного характера вторичной митохондриальной дисфункции у больных с ХОБЛ и служить критерием для назначения митохондриально-ориентированной терапии.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Бельских, Э.С.** Сравнительная оценка уровня окислительного стресса у пациентов с бронхиальной астмой и синдромом перекреста бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких / Э.С. Бельских. – Текст : непосредственный // VII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2017». – Санкт-Петербург, 2017. – С. 62.

2. Комплексная оценка окислительной модификации белков плазмы крови при хронической обструктивной болезни легких / Э.С. Бельских, С.Р. Ахмедова, К.С. Ермоленко [и др.]. – Текст : непосредственный // Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.- Орехово-Зуево, 2017. - С. 22-23. – (Соавт.: П.Д. Ерохина, Н.А. Попко, В.И. Звягина).

3. **Бельских, Э.С.** Комплексная оценка карбонильных производных белков в митохондриях лимфоцитов крови у больных с хронической обструктивной болезнью легких и хроническим бронхитом / Э.С. Бельских, О.М. Урясьев, В.И. Звягина. – Текст : непосредственный // Здоровье человека в XXI веке: X Юбилейная Российская научно-практическая конференция с международным участием: сборник научных статей. – Казань, 2018. - С. 382-386.

4. Изучение митохондриальной дисфункции мононуклеарных лейкоцитов периферической крови у больных с хронической обструктивной болезнью

легких / **Э.С. Бельских**, О.М. Урясьев, В.И. Звягина В.И. [и др.]. – Текст : непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: материалы IV Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань, 2018. – С. 88-90. – (Соавт.: О.Н. Журина, В.Г. Демихов, М.И. Токар).

5. Изучение показателей митохондриальной дисфункции у больных с хронической обструктивной болезнью легких / **Э.С. Бельских**, О.М. Урясьев, В.И. Звягина, С.В. Фалетрова. – Текст : непосредственный // Сборник тезисов XIII Национального конгресса терапевтов. – Москва, 2018. - С.161-162.

6. Исследование маркеров митохондриальной дисфункции мононуклеарных лейкоцитов крови у больных с хронической обструктивной болезнью легких / **Э.С. Бельских**, О.М. Урясьев, В.И. Звягина [и др.]. – Текст : непосредственный // Земский врач. - 2018. - №1. - С.23-26. – (Соавт.: С.В. Фалетрова, Н.А. Попко, С.Р. Ахмедова).

7. Исследование окислительного стресса и функции митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с хроническим бронхитом и с хронической обструктивной болезнью легких / **Э.С. Бельских**, О.М. Урясьев, В.И. Звягина, С.В. Фалетрова. – Текст : непосредственный // **Наука молодых - Eruditio Juvenium**. - 2018. - Т. 6, № 2. - С. 203-210.

8. Развитие вторичной митохондриальной дисфункции мононуклеарных лейкоцитов крови у больных хронической обструктивной болезнью легких и хроническим бронхитом / **Э.С. Бельских**, О.М. Урясьев, В.И. Звягина, С.В. Фалетрова. – Текст : непосредственный // **Казанский медицинский журнал**. - 2018. - Т. 99, № 5. - С. 741-747.

9. Фалетрова, С.В. Клинико-функциональные особенности хронической обструктивной болезни легких у пациентов с ожирением / С.В. Фалетрова, Л.В. Коршунова, **Э.С. Бельских**. – Текст : непосредственный // **Наука молодых - Eruditio Juvenium**. - 2018. - Т. 6, № 3. - С. 439-447.

10. Flow Cytometric Study of Mitochondrial Function in ex-Smokers With COPD in Peripheral Blood Mononuclear Cells / **E.S. Belskikh**, О.М. Uryasev, V.I.

Zvyagina [et al.]. - Text : visual // **PJMHS**. – 2019. -Vol. 13, N. 2. – P. 542-548. –  
(Co-auth.: O.N. Zhurina, V.G. Demikhov, M.I. Tokar).

### **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ДДБД – длительно действующие бета2-агонисты

ДДХЛ – длительно действующие холинолитики

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

ИГКС – ингаляционные глюкокортикостероиды

ММП –  $\Delta\psi$ , митохондриальный мембранный потенциал

ОФВ<sub>1</sub> – объем форсированного выдоха за 1 секунду

РАП ОМБ – резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков

СДГ - сукцинатдегидрогеназа

СОД - супероксиддисмутаза

СП ОМБ – спонтанная окислительная модификация белков

ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

САТ – COPD assessment test, тест оценки ХОБЛ

mMRC - modified Medical Research Council, шкала выраженности одышки

S ОМБ – суммарная площадь под кривой спектра поглощения окислительной модификации белков