

## ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦИНАТ ОПОСРЕДОВАННОГО МЕХАНИЗМА АДАПТАЦИИ К ГИПОКСИИ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ У БОЛЬНЫХ С ХОБЛ

Ахмедова С. Р., Бельских Э.С.

ФГБОУ ВО Рязанский государственный медицинский университет  
им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, г. Рязань

**Ключевые слова:** ХОБЛ; митохондриальная дисфункция; сукцинат; мононуклеарные лейкоциты.

**Резюме:** ХОБЛ сопровождается развитием гипоксии и окислительного стресса, которые могут усугубляться при продолжении воздействия табачного дыма. Существуют различные механизмы адаптации к данным патологическим процессам, в том числе связанный с сукцинатом. Целью данного исследования стало изучение сукцинат опосредованного механизма адаптации к гипоксии у больных с ХОБЛ, в результате чего у пациентов был выявлен срыв в механизмах адаптации к гипоксии.

**Resume:** COPD is associated with the development of hypoxia and oxidative stress, which can be exacerbated by continued exposure to tobacco smoke. There are various mechanisms of adaptation to these pathological processes, including those associated with succinate. The aim of this study was to study the succinate-mediated mechanism of adaptation to hypoxia in patients with COPD, as a result of which a breakdown in the mechanisms of adaptation to hypoxia was revealed in patients.

**Актуальность.** Обострение хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) сопровождается развитием дыхательной недостаточности и тканевой гипоксией [1]. Среди известных механизмов адаптации тканей к гипоксии в настоящее время активно исследуется значение сукцината и сукцинатдегидрогеназы (СДГ), которые участвуют в механизме, связанном с аккумуляцией внутриклеточного сукцината и повышением активности II комплекса дыхательной цепи митохондрий в условиях гипоксии [2, 3]. Этот процесс был установлен в нейронах [2], но почти не исследовался на системном уровне.

В случае неэффективности адаптивных процессов гипоксия становится причиной развития окислительного стресса (ОС) и митохондриальной дисфункции (МД) [1, 3-6]. Оценка уровня мембранного потенциала митохондрий ( $\Delta\psi$ ) позволяет объективно подтвердить развитие митохондриальной дисфункции и оценить её выраженность. Использование для оценки адаптации к гипоксии таких маркеров, как окислительно модифицированные белки (ОМБ) позволяет не только идентифицировать поражение тканей вследствие ОС, но и оценить адаптационный потенциал, связанный с избыточным уровнем генерации активных форм кислорода [9].

В связи с ограниченными возможностями в рамках существующей клинической практики для оценки и характеристики адаптационного потенциала больных с ХОБЛ к гипоксии представляется интересным исследование взаимосвязей показателей сукцинат опосредованного механизма и маркеров окислительной модификации белков в моноядерных лейкоцитах, как наиболее доступного субстрата для оценки в условиях рутинной клинической практики [1].

**Цель:** изучение сукцинат опосредованного механизма адаптации к гипоксии в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с ХОБЛ.

**Задачи:** 1. Исследовать показатели сукцинат опосредованной адаптации моноядерных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ. 2. Сравнить концентрацию маркеров адаптации к гипоксии и выраженность МД у курящих пациентов и экс-курильщиков. 3. Оценить взаимосвязь маркеров МД с показателями сукцинат опосредованной адаптации к гипоксии в моноядерных лейкоцитах.

**Материалы и методы.** В исследовании было включено 34 человека, разделенных на 2 группы: пациенты с неинфекционным обострением ХОБЛ (n=26) в возрасте 67 [59;72] лет и условно здоровые добровольцы (n=8) в возрасте 50,5 [48;55] лет. Из группы пациентов на момент исследования 11 продолжало курить, 15 являлись экс-курильщиками (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика исследуемых групп

	1. Контроль	2. Курильщики	3. Экс-курильщики
Возраст	50,5[47,5;57,5]	61[53;69]	70[63;74]
Вес	77,5[72,5;85,5]	70[63;82]	72[69;84]
ОФВ 1	92[91,5;93,5] p <sub>1-2</sub> = 0,000026 p <sub>1-3</sub> = 0,002949	43[37;58]	58[47;62]
SpO <sub>2</sub>	95,5[97;98] p <sub>1-2</sub> = 0,000231 p <sub>1-3</sub> = 0,007299	92[91;93]	93[92;94]
ИПЛ	0,0[0,0;5] p <sub>1-2</sub> = 0,018669 p <sub>1-3</sub> = 0,046575	15[10;25]	15[0;30]

Забор крови осуществлялся утром натощак на 2-й день госпитализации. Выделение моноядерных лейкоцитов проводили с помощью пробирок с разделительным гелем (BD Vacutainer СРТ, США). Подсчет количества клеток для исследования показателей ОМБ, СДГ и сукцината проводили с помощью камеры Горяева. Для исследования Δψ клетки подсчитывали с помощью системы оценки гемостаза Sysmex ХТ-2000i (Япония).

В суспензии клеток спектрофотометрически определяли ОМБ методом R.L. Levine в модификации Е.Е. Дубининой с последующей комплексной оценкой, предложенной М.А.Фоминой, Ю.В. Абаленихиной [9].

Определение активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) осуществляли при помощи метода, основанного на реакции восстановления, окрашенного феррицианида калия до бесцветного феррицианида калия.

Для определения мембранного потенциала митохондрий использовали метод, основанный на способности мономера 5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолкарбоциинина йодида (JC-1) накапливаться в зависимости от уровня Δψ внутри митохондрий с образованием агрегатов. Мономеры JC-1 характеризуются максимумом интенсивности флуоресценции в зеленом спектре, в то время как для агрегатов JC-1 характерен максимум флуоресценции в красном спектре. В изучаемых образцах с использованием программы Cyflogic определяли

отношение интенсивности красной флуоресценции к зеленой (FL-2/FL1; Red/Green), которое принимали за относительную величину разности потенциалов внутренней мембраны митохондрий ( $\Delta\psi$ ). Для оценки концентрации сукцината использовали набор реактивов Succinate Colorimetric Assay Kit производства Sigma (США).

### Результаты и их обсуждение.

Таблица 2 – Результаты исследования

	1. Контроль	2. Курильщики	3. Экс курильщики
Лейкоциты	0,3061[0,2993; 0,341] $p_{1-2} = 0,007628$	0,2384[0,198;0,2888]	0,2777[0,2388;0,3347]
Лимфоциты	0,3419[0,3301;0,3772] $p_{1-2} = 0,006533$	0,2460[0,2161;0,2892] $p_{2-3} = 0,038173$	0,325[0,2531;0,3903]
Моноциты	0,2196[0,1826;0,2412]	0,1954[0,1089;0,2240]	0,2191[0,1971;0,247]
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин*10 <sup>6</sup> клеток	89[86,5;94] $p_{1-2} = 0,002152$	32[19;68]	68[37;88]
Концентрация сукцината (нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток)	727[661,637;764,71] $p_{1-2} = 0,003298$	297,36[184,96;594,721]	412,53 [316,81;716,49]
Активность СОД, УЕ/10 <sup>6</sup> клеток	68[62;77] $p_{1-2} = 0,002831$	28[9;51]	45[34;65]
ОМБ	24[16;73] $p_{1-2} = 0,000160$	226[199;481]	141[58,5009;216] $p_{1-3} = 0,036247$

$\Delta\psi$  в мононуклеарных лейкоцитах контрольной группы составил 0,306 [0,299; 0,341] и был статистически значимо выше относительно группы больных (0,264 [0,216; 0,301];  $p=0,015$ ) и подгруппы курильщиков (0,238 [0,198; 0,289];  $p=0,008$ ) (таблица 2). Данные результаты свидетельствуют о наличии митохондриальной дисфункции у пациентов, при этом снижение  $\Delta\psi$  происходит под воздействием экзогенных раздражителей в составе табачного дыма, которые приводят к возникновению дефектов в митохондриальной ДНК и в цепи переноса электронов, происходит нарушение митохондриального гомеостаза.

При исследовании активности СДГ, у пациентов с ХОБЛ было выявлено снижение активности фермента в 1,7 ( $p=0,002$ ), при этом у пациентов, продолжающих курить, показатель оказался ниже в 2,2 раз ( $p=0,002$ ). Концентрация сукцината у контрольной группы оказалось выше, чем у опытной в 2 раза и в 2,4 раз по сравнению с курящими пациентами ( $p=0,003$ ). Полученные результаты указывают на срыв в механизмах сукцинат-опосредованной адаптации к гипоксии.

Одной из причин нарушения адаптации могла быть окислительная модификация ферментов, развивающаяся в условиях окислительного дистресса. Это нашло отражение в более высоком уровне ОМБ у больных ХОБЛ по сравнению с показателем контрольной группы (198 [90,96; 236];  $p=0,0001$ ). При этом достоверные различия отмечались как с курящими пациентами, так и с экс-

курильщиками. Повышение уровня окислительной модификации белков подтверждает выраженность окислительного стресса у пациентов с ХОБЛ, что может быть связано с повышенным образованием активных форм кислорода в митохондриальной цепи и активацией НАДФН-оксидазы и требует дальнейшего изучения [7].

Отсутствие статистически значимых различий между подгруппами курильщиков и экс-курильщиков может быть связано с клиническими особенностями пациентов в этих группах или же с необратимостью изменений в белках даже при отказе от курения [6].

При исследовании взаимосвязи маркеров окислительного стресса с показателями сукцинат опосредованного механизма адаптации к гипоксии была выявлена достоверная связь средней силы ( $r_s\Delta\psi/\text{СДГ}=0,446$ ;  $r_s\Delta\psi/\text{сукцинат}=0,45$ ;  $r_s\text{ОМБ}/\text{СДГ}=-0,67$ ;  $r_s\text{ОМБ}/\text{сукцинат}=-0,735$ ;  $p<0,05$ ), что указывает на возможную роль сукцината в поддержании гомеостаза в мононуклеарных лейкоцитах.

**Выводы:** у больных с обострением ХОБЛ отмечается срыв в механизмах адаптации к гипоксии. Выявлена корреляционная связь средней силы между показателями сукцинат опосредованного механизма адаптации к гипоксии и маркерами окислительного стресса.

#### Литература

- 1.GOLD 2018 Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD. Available at: [http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov\\_WMS.pdf](http://goldcopd.org/wp-content/uploads/2017/11/GOLD-2018-v6.0-FINAL-revised-20-Nov_WMS.pdf)
- 2.Lukyanova L.D., Kirova Y.I. Mitochondriacontrolled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia // *Frontiers in Neuroscience*. 2015.Vol. 9. P. 320. doi:10.3389/fnins.2015.00320
- 3.Бельских Э.С., Урясьев О.М., Звягина В.И., и др. Исследование окислительного стресса и функции митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах крови у больных с хроническим бронхитом и с хронической обструктивной болезнью легких // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2018. Т. 6, №2. С. 203-210. doi:10.23888/HMJ201862203-210
- 4.Бельских Э.С., Урясьев О.М., Звягина В.И., Фалетрова С.В. Развитие вторичной митохондриальной дисфункции мононуклеарных лейкоцитов крови у больных хронической обструктивной болезнью легких и хроническим бронхитом// *Казанский медицинский журнал*. 2018. Т. 99, №5, С. 741-747
- 5.Nam HS, Izumchenko E, Dasgupta S, Hoque MO. Mitochondria in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: where are we now? *Biomarkers in Medicine* 2017;11(6):475-489
- 6.Hoffmann RF, Zarrintan S, Brandenburg SM, et al. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells. *Respir Res*. 2013;14(1):1–13
- 7.Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23(9):734-746. doi:10.1089/ars.2015.6247
- 8.Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М.И. Прохоровой. Л.: Издательство Ленинградского университета. 1982. 327 с.
- 9.Фомина М.А., Абаленихина Ю.В. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации. Рязань: РИО РязГМУ, 2014.