

Патогенетические особенности мембранных нарушений иммунокомпетентных клеток при сочетанном течении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких

Ю.К.Денисенко¹, Т.П.Новгородцева¹, М.В.Антонюк^{1,2}, Т.А.Гвозденко¹, Н.В.Жукова^{2,3}, Т.И.Виткина¹, Б.И.Гельцер¹

- 1 – Владивостокский филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения: 690105, Россия, Владивосток, ул. Русская, 73г;
- 2 – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»: 690091, Владивосток, ул. Суханова, 8;
- 3 – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии имени А.В.Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук: 690041, Россия, Владивосток, ул. Пальчевского, 17

Информация об авторах

Денисенко Юлия Константиновна – д. б. н., заведующая лабораторией биомедицинских исследований Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения; тел.: (423) 278-82-05; e-mail: karaman@inbox.ru

Новгородцева Татьяна Павловна – д. б. н., профессор, заместитель директора по НИР Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения; тел.: (423) 278-82-02; e-mail: nauka@niivl.ru

Антонюк Марина Владимировна – д. м. н., профессор, заведующая лабораторией восстановительного лечения Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения, профессор департамента клинической медицины Школы биомедицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»; тел.: (423) 278-82-05; e-mail: antonyukm@mail.ru

Гвозденко Татьяна Александровна – д. м. н., профессор Российской академии наук, директор Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения; тел.: (423) 278-82-01; e-mail: tagvozdenco@mail.ru

Жукова Наталья Владимировна – д. б. н., ведущий научный сотрудник Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», ведущий научный сотрудник лаборатории сравнительной биохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Национальный научный центр морской биологии имени А.В.Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук; тел.: (423) 231-09-37; e-mail: nzjukova35@list.ru

Виткина Татьяна Исаковна – д. б. н., профессор Российской академии наук, заведующая лабораторией медицинской экологии и рекреационных ресурсов Владивостокского филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательского института медицинской климатологии и восстановительного лечения; тел.: (423) 278-82-05; e-mail: tash30@mail.ru

Гельцер Борис Израилевич – д. м. н., профессор, член-корреспондент Российской академии наук, директор департамента клинической медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»; тел.: (423) 240-42-28; e-mail: geltcer.bi@dvfu.ru

Резюме

Коморбидное течение хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) и бронхиальной астмы (БА) является одной из важных проблем в пульмонологии, при этом многие патогенетические, диагностические и терапевтические аспекты указанной проблемы остаются нерешенными. **Целью** исследования явилось установление патогенетических особенностей мембранных нарушений иммунокомпетентных клеток при сочетанном течении ХОБЛ и БА на основании изучения состава жирных кислот мембран лейкоцитов, уровня оксипинов, мембранного потенциала митохондрий лейкоцитов. **Материалы и методы.** В исследовании принимали участие больные ХОБЛ I и II спирометрического класса стабильного течения ($n = 39$), БА легкой степени тяжести контролируемого и частично контролируемого течения ($n = 41$), а также лица с коморбидным течением ХОБЛ I и II спирометрического класса и БА легкой степени тяжести контролируемого и частично контролируемого течения ($n = 18$); контрольную группу составили здоровые добровольцы ($n = 28$). Исследование состава жирных кислот мембран лейкоцитов проводилось методом газожидкостной хроматографии. Содержание тромбоксана B_2 (ТХВ₂) и лейкотриена B_4 (ЛТВ₄) определялось иммуоферментным методом. Уровень мембранного потенциала митохондрий лейкоцитов исследовался *ex tempore* методом цитофлуориметрии. Статистическая значимость различий средних величин определялась по *t*-критерию Стьюдента. **Результаты.** У пациентов с сочетанным течением ХОБЛ и БА в мембране лейкоцитов происходит накопление насыщенных жирных кислот (12 : 0, 16 : 0, 18 : 0, 20 : 0) на фоне дефицита $n-6$ и $n-3$ полиненасыщенных жирных кислот (18 : 2 $n-6$, 20 : 3 $n-6$, 20 : 4 $n-6$, 20 : 5 $n-3$, 22 : 4 $n-6$, 22 : 6 $n-3$). Изменения в липидоме лейкоцитов способствуют нарушению структурных и функциональных характеристик клетки, синтезу оксипинов, что подтверждается увеличением числа клеток со сниженным мембранным потенциалом митохондрий и уровня провоспалительных медиаторов – ТХВ₂ и ЛТВ₄. **Заключение.** Нарушение архитектуры цитомембраны иммунокомпетентных клеток является первичным патогенетическим звеном в дисфункции работы всей иммунной системы, фундаментальной основой механизма развития коморбидной патологии органов дыхания.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, бронхиальная астма, мембрана лейкоцитов, иммунная система, жирные кислоты, мембранный потенциал митохондрий.

Для цитирования: Ю.К.Денисенко, Новгородцева Т.П., Антонюк М.В., Гвозденко Т.А., Жукова Н.В., Виткина Т.И., Гельцер Б.И. Патогенетические особенности мембранных нарушений иммунокомпетентных клеток при сочетанном течении бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких. *Пульмонология*. 2018; 28 (6): 647–654. DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-6-647-654

Pathogenesis of immune cell membrane abnormalities in comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma

Yuliya K. Denisenko¹, Tat'yana P. Novgorodtseva¹, Marina V. Antonyuk^{1,2}, Tat'yana A. Gvozdenko¹, Natal'ya V. Zhukova^{2,3}, Tat'yana I. Vitkina¹, Boris I. Gel'tser²

1 – Vladivostok branch of Federal Far Eastern Research Center of Physiology and Respiratory Pathology, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation: ul. Russkaya 73g, Vladivostok, 690105, Russia;

2 – Far Eastern Federal University: ul. Sukhanova 8; Vladivostok, 690091, Russia;

3 – A.V.Zhirmunskiy National Research Center of Sea Biology, Far Eastern Department of Russian Academy of Science: ul. Pal'chevskogo 17, Vladivostok, 690041, Russia

Author information

Yuliya K. Denisenko, Doctor of Biology, Head of Laboratory of Biomedical Research, Vladivostok branch of Federal Far Eastern Research Center of Physiology and Respiratory Pathology, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation; tel.: (423) 278-82-05; e-mail: karaman@inbox.ru

Tat'yana P. Novgorodtseva, Doctor of Biology, Professor, Deputy Director for Science, Vladivostok branch of Federal Far Eastern Research Center of Physiology and Respiratory Pathology, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation; tel.: (423) 278-82-02; e-mail: nauka@niivl.ru

Marina V. Antonyuk, Doctor of Medicine, Professor, Head of Laboratory of Rehabilitation, Vladivostok branch of Federal Far Eastern Research Center of Physiology and Respiratory Pathology, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation; Professor at Department of Clinical Medicine, Biomedical School, Far Eastern Federal University; tel.: (423) 278-82-05; e-mail: antonyukm@mail.ru

Tat'yana A. Gvozdenko, Doctor of Medicine, Professor of Russian Academy of Sciences, Director of Vladivostok branch of Federal Far Eastern Research Center of Physiology and Respiratory Pathology, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation; tel.: (423) 278-82-01; e-mail: tagvozdenko@mail.ru

Natal'ya V. Zhukova, Doctor of Biology, Leading Researcher, Far Eastern Federal University; Leading Researcher, Laboratory of Comparative Biochemistry, A.V.Zhirmunskiy National Research Center of Sea Biology, Far Eastern Department of Russian Academy of Science; tel.: (423) 231-09-37; e-mail: nzhukova35@list.ru

Tat'yana I. Vitkina, Doctor of Biology, Professor of Russian Academy of Sciences, Head of Laboratory of Medical Ecology and Recreation Resources, Vladivostok branch of Federal Far Eastern Research Center of Physiology and Respiratory Pathology, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation; tel.: (423) 278-82-05; e-mail: tash30@mail.ru

Boris I. Gel'tser, Doctor of Medicine, Professor, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Director of Department of Clinical Medicine, Far Eastern Federal University; tel.: (423) 240-42-28; e-mail: geltser.bi@dvfu.ru

Abstract

The objective of this study was to investigate a role of fatty acid content in leukocyte membranes, oxylipin level and membrane potential of leukocyte membranes in the pathogenesis of immune cell membrane abnormalities in patients with comorbidity of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Methods.** The study involved 39 patients with COPD, 41 patients with asthma, and 18 patients with comorbidity of COPD and asthma, and 28 healthy volunteers as controls. Fatty acid content of leukocyte membranes was investigated using gas-liquid chromatography. Thromboxane B2 and leukotriene B4 levels were measured using enzyme immunoassay. Mitochondrial membrane potential in leukocytes was measured ex tempore by cytofluorimetry. Statistically significant difference between mean values was determined by Student's t-test. **Results.** The comorbidity of COPD and asthma was characterized by accumulation of saturated fatty acids (12 : 0; 16 : 0; 18 : 0; 20 : 0) in leukocyte membrane and reduction in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (18 : 2n-6; 20 : 3n-6; 20 : 4n-6; 20 : 5n-3; 22 : 4n-6; 22 : 6n-3). Changes in leukocyte lipidome contribute to development of structural and functional abnormalities of the cells and to the synthesis of oxylipins. This is confirmed by increased number of cells with reduced mitochondrial membrane potential and increased level of proinflammatory mediators, such as thromboxane B2 and leukotriene B4. **Conclusion.** Structural abnormalities of immune cell membrane should be considered as the primary pathological pathway to general dysfunction of the immune system and the basic mechanism of development of respiratory comorbidity.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, asthma, leukocyte membrane, immune system, fatty acids, membrane potential of mitochondria.

For citation: Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A., Zhukova N.V., Vitkina T.I., Gel'tser B.I. Pathogenesis of immune cell membrane abnormalities in comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Russian Pulmonology*. 2018; 28 (6): 647–654 (in Russian). DOI: 10.18093/0869-0189-2018-28-6-647-654

Актуальность изучения проблемы сочетанного течения бронхиальной астмы (БА) и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ) обусловлено высокой их распространенностью среди лиц с бронхолегочными заболеваниями, а также трудностью диагностических и терапевтических подходов [1–4]. Согласно эпидемиологическому исследованию, частота встречаемости сочетания ХОБЛ и БА среди пациентов с заболеваниями органов дыхания составляет 10–20 %. У 50–59-летних больных показатель распространенности составляет около 23 %, а у 70–79-летних — увеличивается до 52 % [3, 4].

Патогенетической основой ХОБЛ и БА является хронический воспалительный процесс в бронхолегочной системе, нарушающий целостность эпителиального пласта и обуславливающий запуск бронхо-

констрикторных процессов [5]. Однако природа воспаления и механизмы обструкции ХОБЛ и БА заметно отличаются друг от друга. В то же время по данным исследований [5, 6] показано, что коморбидное течение ХОБЛ и БА имеет как хронические обструктивные характеристики воспаления дыхательных путей, так и астматические признаки, сопровождающиеся повышением уровня эозинофилов и нейтрофилов. Предположительно в механизме сочетания ХОБЛ и БА имеет место объединение патогенетических процессов и усиление иммуноопосредованных нарушений. Так, по результатам проведенных ранее клинико-иммунологических исследований показано, что в основе коморбидного течения ХОБЛ и БА находится дальнейшее усиление процесса воспаления, присутствующего и в стабильном состоянии

заболеваний [6, 7]. Установлено, что при сочетанном течении ХОБЛ и БА воспалительные процессы развиваются по Th-1- и Th-2-типу иммунного ответа с привлечением реагинов, цитокинов, эйкозаноидов и превращаются в основную движущую силу патологического процесса [7]. Выявленные особенности нарушения иммунной системы у пациентов с коморбидным течением ХОБЛ и БА могут быть ассоциированы со специфическими изменениями в структурно-функциональном состоянии клеток иммунной системы, нарушением архитектоники их цитомембран и функций внутриклеточных органоидов.

Патология клеточных мембран иммунокомпетентных клеток, в частности лейкоцитов, вследствие активации перекисного окисления липидов, проявлений трансмембранной асимметрии фосфолипидов, дефицита полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и т. п. является одним из важнейших механизмов нарушения функций системы иммунитета [8, 9]. Патогенетическая значимость модификации жирных кислот (ЖК) цитомембран обусловлена функциональной ролью липидов в клеточных структурах. Изменения в составе ЖК мембраны лейкоцитов могут оказывать кардинальное влияние на синтез липидных медиаторов — оксипинов (эйкозаноиды), модулирующих иммунный ответ через хемотаксические, аутокринные либо паракринные эффекты [10]. Вместе с тем значение ЖК и их метаболитов в патогенезе коморбидного течения ХОБЛ и БА изучено недостаточно. В рамках данной работы продолжен цикл работ по установлению иммуноопосредованных клеточно-молекулярных механизмов при сочетании ХОБЛ и БА [6, 7].

Целью настоящего исследования явилось установление патогенетических особенностей мембранных нарушений иммунокомпетентных клеток при сочетанном течении ХОБЛ и БА на основании изуче-

ния состава ЖК мембран лейкоцитов, уровня оксипинов, мембранного потенциала митохондрий лейкоцитов.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие больные ХОБЛ ($n = 126$: 70 мужчин, 56 женщин), в т. ч. I и II спирометрического класса стабильного течения ($n = 39$); БА легкой степени тяжести контролируемого и частично контролируемого течения ($n = 41$); с коморбидным течением ХОБЛ I и II спирометрического класса и БА легкой степени тяжести контролируемого и частично контролируемого течения ($n = 18$). Контрольную группу составили некурящие и никогда не курившие здоровые добровольцы ($n = 28$: 14 мужчин и 14 женщин) без отягощенного аллергического анамнеза, с нормальной функцией внешнего дыхания. Обследование пациентов проводилось после подписания информированного согласия и в соответствии со стандартами Хельсинкской декларации (2013).

Пациенты с заболеваниями бронхолегочной системы и здоровые добровольцы были выявлены при обследовании организованных коллективов. Характеристика участников исследования представлена в табл. 1. В группе пациентов с БА ($n = 41$) преобладали женщины (65,8 %). При верификации диагноза в 16 (39 %) случаях установлено контролируемое течение БА, у 25 (61,5 %) — частично контролируемая БА. В этой группе курящие составили 34 %. Наличие сенсibilизации к бытовым, пищевым, пыльцевым аллергенам прослеживалось у 32 (82 %), наследственная отягощенность — у 9 (23,1 %) больных. В группе пациентов с ХОБЛ ($n = 39$) в 9 (23 %) случаях диагностирована ХОБЛ легкой степени, в 30 (77 %) — ХОБЛ средней степени стабильного тече-

Таблица 1
Клинико-функциональная характеристика пациентов, включенных в исследование
Table 1
Clinical and functional characteristics of patients

Показатель	Контроль ($n = 28$)	БА ($n = 41$)	ХОБЛ ($n = 39$)	БА + ХОБЛ ($n = 18$)
Возраст, годы	39,80 ± 2,52	42,60 ± 2,38	60,50 ± 2,34	58,30 ± 1,53
Пол:				
• мужчины	14	14	34	11
• женщины	14	27	5	7
Статус курения:				
• курят в настоящее время	0	14	35	16
• курили в прошлом	0	5	2	2
Индекс курения, пачко-лет	0	5,35 ± 1,20	27,60 ± 6,87	26,30 ± 4,73
ОФВ ₁ после пробы, %дож.	105,10 ± 3,05	95,56 ± 7,62	67,60 ± 2,88	61,72 ± 2,40
ОФВ ₁ / ФЖЕЛ после пробы, %	81,56 ± 3,05	74,53 ± 5,33	56,70 ± 2,47	63,50 ± 4,48
Прирост ОФВ ₁ после пробы, %	0	16,20 ± 3,46	6,70 ± 2,67	12,80 ± 2,76
Одышка по шкале mMRC, баллы	0	—	1,24 ± 0,10	1,50 ± 0,06
Влияние ХОБЛ на здоровье пациента по CAT, баллы	0	—	9,40 ± 1,06	11,30 ± 1,14
Уровень контроля БА по ACQ-5, баллы	0	0,68 ± 0,06	—	0,83 ± 0,04

Примечание: БА — бронхиальная астма; ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких; ОФВ₁ — объем форсированного выдоха за 1-ю секунду; ФЖЕЛ — форсированная жизненная емкость легких; mMRC (Modified Medical Research Council) — модифицированная шкала одышки; CAT (COPD Assessment Test) — оценочный тест по ХОБЛ; ACQ-5 (Asthma Control Questionnaire) — опросник по контролю над бронхиальной астмой.

ния. Большинство (87,2 %) пациентов с ХОБЛ составляли мужчины, 89,7 % из которых курили. Влияние ХОБЛ на повседневную жизнь у обследованных было незначительным.

У всех лиц с коморбидным течением ХОБЛ и БА ($n = 18$; 61 % — мужчины) диагностированы ХОБЛ средней степени тяжести и частично контролируемая БА. Преобладающее большинство (88,9 %) являлись курильщиками или курили в прошлом. Одышка по шкале mMRC была максимальной у больных с коморбидным течением ХОБЛ и БА. По результатам оценочного теста по ХОБЛ (COPD Assessment Test — CAT) в этой группе указывалось на умеренное влияние заболевания на качество жизни. Уровень контроля над БА согласно опроснику по контролю над бронхиальной астмой (Asthma Control Questionnaire — ACQ-5) у лиц с коморбидным течением ХОБЛ и БА был меньше на 31,7 % по сравнению с таковым у больных БА. Сенсибилизация к аллергенам имела место в 12 (66,6 %), наследственная отягощенность — в 7 (38,8 %), эпизоды БА до 40 лет — в 9 (50 %) случаях.

Заболевания диагностировались на основании данных анамнеза, объективного осмотра, данных пикфлоуметрии, спирометрии (спирограф Fukuda, Япония) с выполнением бронходилатационного теста, а также лабораторного исследования. Диагностика ХОБЛ проводилась согласно критериям Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики ХОБЛ (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease — GOLD, 2017), БА — согласно критериям Глобальной стратегии лечения и профилактики БА (Global Initiative for Asthma — GINA, 2017) [1, 2]. Для оценки вариабельности бронхо-

обструкции выполнялся стандартный бронходилатационный тест — увеличение значения объема форсированного выдоха за 1-ю секунду (ОФВ₁) на 200 мл от базового уровня и > 12 % свидетельствовало о положительном ответе на введение бронходилататора. Для оценки симптомов основного заболевания проводилось анкетирование с помощью валидизированных тестов: модифицированного опросника для оценки выраженности одышки Британского медицинского исследовательского совета (Modified British Medical Research Council — mMRC); ACQ-5 и CAT. Критериями включения в исследование являлось отсутствие симптомов обострения ХОБЛ и БА в течение последних 2 мес. Критериями исключения являлись наличие профессиональных заболеваний бронхолегочной системы, сердечно-сосудистых заболеваний (ишемическая болезнь сердца, гипертоническая болезнь) и их осложнений, сахарного диабета, заболеваний щитовидной железы, острых патологических состояний и обострений хронических болезней.

Лейкоциты периферической крови выделялись на градиенте фиколл-верографина. Липиды из мембран лейкоцитов экстрагировались смесью хлороформа и метанола в объеме 1 : 2 [11, 12]. Метилвые эфиры экстрагировались гексаном и очищались микротонкослойной хроматографией в бензоле. Перерастворенные в гексане метилвые эфиры ЖК анализировались на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Япония), снабженном пламенно-ионизационным детектором, капиллярной колонкой (0,25 мм × 30 м) с привитой фазой Supelcowax 10. Температура колонки составляла 210 °С, температура детектора — 250 °С. Газ-носи-

Таблица 2
Состав основных жирных кислот мембран лейкоцитов у пациентов с коморбидным течением хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы (% от суммы жирных кислот)
Table 2
Fatty acid content in leukocyte membrane in patients with comorbidity of asthma and COPD (% of the total content of fatty acids)

Жирные кислоты	Контрольная группа (здоровые)	Группа больных БА	Группа больных ХОБЛ	Группа больных ХОБЛ + БА
12 : 0 (лауриновая)	0,51 ± 0,09	0,91 ± 0,03*	0,81 ± 0,04*	0,72 ± 0,02**
14 : 0 (миристиновая)	2,40 ± 0,29	2,25 ± 0,37	1,94 ± 0,35	2,87 ± 0,27
16 : 0 (пальмитиновая)	26,61 ± 1,59	25,05 ± 1,55	30,70 ± 1,08*	28,54 ± 1,03**
18 : 0 (стеариновая)	17,50 ± 0,82	19,68 ± 0,42*	21,83 ± 1,34*	20,31 ± 0,18*
20 : 0 (арахидиновая)	0,71 ± 0,08	0,64 ± 0,07	0,88 ± 0,01	1,04 ± 0,07*, **, ***
18 : 2n-6 (линолевая)	13,63 ± 0,61	9,44 ± 0,77*	9,35 ± 0,74*	9,54 ± 0,23*
18 : 3n-3 (α-линоленовая)	0,44 ± 0,10	Следы	0,11 ± 0,01*	Следы
20 : 3n-6 (дигомо-γ-линоленовая)	0,81 ± 0,09	1,02 ± 0,01*	1,36 ± 0,05*	0,45 ± 0,71*, **, ***
20 : 4n-6 (арахидиновая)	12,33 ± 1,56	14,59 ± 2,41*	14,62 ± 0,51*	9,42 ± 0,41*, **, ***
20 : 5n-3 (эйкозапентаеновая)	0,72 ± 0,12	0,41 ± 0,01*	0,48 ± 0,02*, **	0,24 ± 0,01*, **, ***
22 : 4n-6 (докозатетраеновая)	1,78 ± 0,13	1,26 ± 0,01*	1,18 ± 0,04*	0,90 ± 0,01*, **, ***
22 : 5n-3 (докозапентаеновая)	0,92 ± 0,07	1,13 ± 0,01	0,98 ± 0,15	0,84 ± 0,70
22 : 6n-3 (докозагексаеновая)	2,63 ± 0,41	1,56 ± 0,01*	1,64 ± 0,03*, **	1,34 ± 0,04*, **, ***

Примечание: ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь легких; БА — бронхиальная астма; статистическая значимость различий относительно: * — контрольной группы ($p < 0,01$),

** — группы пациентов с БА ($p < 0,01$), *** — группы пациентов с ХОБЛ ($p < 0,01$).

Notes. Statistically significant difference is shown compared: *, to the control group ($p < 0,01$); **, to patients with asthma ($p < 0,01$); ***, to patients with COPD ($p < 0,01$).

тель — гелий. ЖК идентифицировались по относительным временам удерживания и расчетным значениям эквивалентной длине цепи, т. е. значениям «углеродных чисел». Результаты выражались в процентах от суммы ЖК.

Содержание оксипинов в сыворотке крови оценивалось по количеству их стабильных метаболитов — тромбоксана В₂ (ТХВ₂) и лейкотриена В₄ (ЛТВ₄). Для выделения оксипинов использовались мини колонки (*Minicolumns for Sample Preparation*, США); количественный уровень определялся иммуноферментным методом с использованием тест-системы *Biotrak EIA system* (Amersham Biosciences, Великобритания). Измерение проводилось в плоскодонных 96-луночных планшетах на спектрофотометре (*Biotek Power Wave*, США).

Уровень мембранного потенциала митохондрий (МПМ) лейкоцитов исследовался *ex tempore* при помощи проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II™ (*Becton, Dickinson*, США) с применением красителя сафранина О,5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-йодид тетраэтилбензимидазолил-карбоцианина (JC-1). Мембранный потенциал митохондрий оценивался в процентном количестве клеток со сниженным МПМ [13].

Данные анализировались с использованием прикладной программы *Statistica*, версия 6,1 (серия 1203С для *Windows*). Статистическая значимость различий средних величин определялась по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Изучался липидом мембран лейкоцитов по качественному и количественному составу индивидуальных ЖК (табл. 2). В составе ЖК мембран лейкоцитов у обследованных выделено 39 кислот — насыщенных, моноеновых и полиненасыщенных, нормального и изостроения, длина цепи составляла от С12 до С24 как с четным, так и с нечетным числом углеродных атомов. В табл. 2 не внесены отдельные представители ЖК, содержание которых не превышает 0,1 %. В основном это насыщенные кислоты нормального строения (10 : 0, 19 : 0, 20 : 0, 22 : 0), некоторые моноеновые (14 : 1, 18 : 1n5, 20 : 1, 22 : 1), диеновые (18 : 2n5/9), триеновые (20 : 3n3), ЖК изо- и антизостроения.

При анализе количественного состава ЖК мембран лейкоцитов у пациентов с БА выявлено увеличение доли насыщенных лауриновой (12 : 0) и стеариновой (18 : 0) ЖК по сравнению с показателями у здоровых лиц ($p < 0,01$). Отмечалось снижение уровня эссенциальной линолевой (18 : 2n-6; $p < 0,01$) и α -линоленовой (18 : 3n-3; $p < 0,01$) ЖК на фоне увеличения содержания арахидоновой кислоты (20 : 4n-6; $p < 0,01$), при этом доля основного антагониста арахидоновой ЖК — эйкозапентаеновой (20 : 5n-3), напротив, снижалась в 1,75 раза относительно контрольной группы ($p < 0,01$).

У пациентов с ХОБЛ модификация состава ЖК лейкоцитов характеризовалась увеличением отно-

сительного содержания насыщенных лауриновой ($p < 0,01$), пальмитиновой (16 : 0; $p < 0,01$), стеариновой ($p < 0,01$) кислот. В ряду ПНЖК семейства n-6 отмечалось истощение пула линолевой (18 : 2n-6; $p < 0,01$), докозатетраеновой (22 : 4n-6; $p < 0,01$) при повышении уровня арахидоновой кислоты относительно контрольной группы ($p < 0,01$). Среди n-3 ПНЖК у больных ХОБЛ в мембране лейкоцитов выявлено снижение доли эйкозапентаеновой (20 : 5n-3; $p < 0,01$), докозагексаеновой (22 : 6n-3; $p < 0,01$) кислот.

Отличительной особенностью состава ЖК мембраны лейкоцитов у пациентов с коморбидным течением ХОБЛ и БА стало увеличение пула насыщенных лауриновой (12 : 0; $p < 0,01$), пальмитиновой (16 : 0; $p < 0,01$), стеариновой (18 : 0; $p < 0,01$) и арахидоновой (20 : 0; $p < 0,01$) кислот. Вместе с тем в мембране лейкоцитов отмечалось снижение доли некоторых n-6 ПНЖК (дигомо- γ -линолевой — 20 : 3n-6, 20 : 4n-6, 22 : 4n-6) как по сравнению с контрольной группой, так и относительно пациентов с ХОБЛ и БА ($p < 0,01$ — для всех показателей). Также обращает внимание значительное снижение длинноцепочечных n-3 ПНЖК (20 : 5n-3, 22 : 6n-3). Выявленное накопление насыщенных ЖК в мембране лейкоцитов способствует увеличению жесткости липидного бислоя, что приводит к уменьшению ее текучести и активности мембрана-ассоциированных ферментов, нарушению экспрессии рецепторов [14, 15]. Одновременное понижение уровня ПНЖК при бронхолегочной патологии свидетельствует об активации метаболических превращений данных ЖК, в т. ч. интенсификации синтеза провоспалительных оксипинов [10, 14].

Выявленные изменения в составе длинноцепочечных n-3 и n-6 ПНЖК у пациентов с коморбидным течением ХОБЛ и БА могут быть ассоциированы с нарушением синтеза оксипинов. Среди множества медиаторов воспаления ключевая роль при бронхолегочных заболеваниях отводится оксигеназным производным ЖК — оксипинам [14]. В рамках данного исследования изучено содержание ТХВ₂ и ЛТВ₄ в сыворотке крови у больных ХОБЛ и БА (табл. 3).

У пациентов с БА наблюдалось увеличение содержания ТХВ₂ и ЛТВ₄. У больных ХОБЛ уровень ЛТВ₄ был повышен относительно лиц контрольной группы, но значительно снижен по сравнению с пациентами с БА. При сочетанном течении ХОБЛ и БА отмечалось 8-кратное повышение провоспалительного оксипина ЛТВ₄ и увеличение содержания ТХВ₄ в 2 раза, т. е. течение хронического воспаления у больных ХОБЛ и БА опосредуется интенсивной продукцией оксигеназных провоспалительных и бронхоконстрикторных медиаторов ЖК.

Маркером жизнеспособности клетки, оптимального протекания окислительно-восстановительных процессов, а также критерием апоптоза является МПМ [13, 16]. Определение МПМ является одним из наиболее адекватных методов исследования ее функционального состояния. При оценке содержа-

Таблица 3
Уровень оксипинов в сыворотке крови у пациентов с коморбидным течением
хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы
Table 3
Blood serum oxylipin levels in patients with comorbidity of asthma and COPD

Оксипин, пг / мл	Контрольная группа (здоровые)	Больные БА	Больные ХОБЛ	Больные ХОБЛ + БА
ЛТВ ₄	10,3 ± 1,4	50,5 ± 2,0*	18,0 ± 1,2*, **	86,7 ± 1,2*, **
ТХВ ₂	15,87 ± 1,07	34,77 ± 2,17*	31,36 ± 2,07*, **	22,00 ± 2,07*, **

Примечание: ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; БА – бронхиальная астма; ТХВ₂ – тромбоксан В₂; ЛТВ₄ – лейкотриен В₄; статистическая значимость различий относительно: * – контрольной группы ($p < 0,01$), ** – группы пациентов с БА ($p < 0,01$).

Notes. Statistically significant difference is shown compared: *, to the control group ($p < 0.01$); **, to patients with asthma ($p < 0.01$).

ния лейкоцитов со сниженным МПМ в группах обследуемых выявлено значительное повышение данного показателя у лиц с ХОБЛ и БА (см. рисунок).

В группе больных БА доля клеток со сниженным МПМ составила 2,01 % ($p < 0,001$), что в 2 раза выше относительно лиц контрольной группы (у здоровых – 1,08 %). У пациентов с ХОБЛ значение МПМ было в 3 раза выше такового в группе здоровых (3,15 %) ($p < 0,001$). У больных с коморбидным течением ХОБЛ и БА количество лейкоцитов со сниженным МПМ составило 3,9 % ($p < 0,001$). Выявленное увеличение количества лейкоцитов со сниженным МПМ при бронхолегочной патологии свидетельствует об уменьшении энергообеспечения клетки, кислородном голодании и активации апоптотических механизмов клеток иммунной системы [13].

Обобщая полученные результаты исследования, можно выделить ключевые патогенетические особенности структурно-функционального состояния лейкоцитов при коморбидном течении ХОБЛ и БА. При сочетании ХОБЛ и БА происходит увеличение жесткости мембраны лейкоцитов, с одной стороны – за счет накопления насыщенных ЖК (12 : 0, 16 : 0, 18 : 0, 20 : 0), с другой – за счет дефицита n-6 и n-3 ПНЖК – ключевых компонентов, определяющих текучесть и пластичность клеточных и субклеточных мембран. Увеличение жесткости липидного бислоя приводит к нарушению структурных и функцио-

нальных характеристик клетки, работы ионных каналов, активному экзо- и эндогенному транспорту биомолекул, уменьшению активности мембраносвязанных ферментов, торможению связывания рецепторов с лигандами, повышает риск деструкции мембран и гибели клетки по механизму апоптоза или некроза [8, 9]. Увеличение числа лейкоцитов со сниженным мембранным потенциалом у пациентов с сочетанием ХОБЛ и БА подтверждает нарушение биохимических реакций энергетического обмена, а также рост апоптотических процессов иммунных клеток.

Одновременное понижение пула длинноцепочечных ЖК свидетельствует об активации синтеза оксипинов [14, 17]. Данный факт подтверждается высоким содержанием провоспалительных оксигеназных производных арахидоновой кислоты – ТХВ₂, ЛТВ₄ в сыворотке крови у пациентов с бронхолегочными заболеваниями. Центральная роль ЛТВ₄ в иммунном ответе заключается в активации хемотаксиса и секреции лейкоцитов, продукции цитокинов, иммуноглобулина (Ig) E, PRARα [17]. Очевидна взаимосвязь между высоким производством ТХВ₂, ЛТВ₄ и выявленной ранее гиперсекрецией провоспалительных цитокинов, IgE у больных ХОБЛ и БА [7], причем установленный значительный дефицит эйкозапентаеновой кислоты (20 : 5n-3) в мембране лейкоцитов усугубляет дисбаланс в синтезе противовоспалительных и вазодилатационных оксипинов. Известно, что недостаток эндогенных n-3 ПНЖК в клетках приводит к изменению физико-химических свойств плазматических мембран, активации синтеза оксипинов с провоспалительной и бронхоконстрикторной активностью [8]. «Замкнутый круг» между этими процессами создает условия для истощения иммунного ответа и формирования хронического системного воспаления. По результатам исследований показано, что при коморбидном течении ХОБЛ и БА постоянное поддержание хронического системного воспаления обеспечивается за счет высокой, непрекращающейся продукции провоспалительных оксипинов. В то же время в условиях перманентной потребности клетки в ПНЖК n-6 и ПНЖК n-3 алиментарное поступление последних не компенсирует нарастающий дефицит мембранных ЖК. Происходит утяжеление нарушений как структурной, так и функциональной роли лейкоцитов при совместном течении ХОБЛ и БА. Сле-

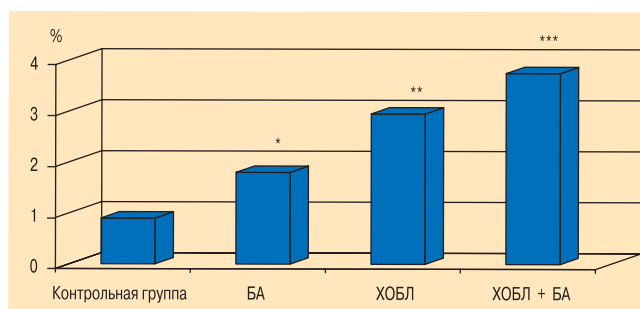


Рисунок. Мембранный потенциал митохондрий лейкоцитов у пациентов с коморбидным течением хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы

Примечание: БА – бронхиальная астма; ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких; статистическая значимость различий относительно: * – контрольной группы ($p < 0,01$); ** – группы пациентов с БА ($p < 0,01$); *** – группы пациентов с ХОБЛ ($p < 0,01$).

Figure. Mitochondrial membrane potential in leukocytes of patients with comorbidity of asthma and COPD

Notes. Statistically significant difference is shown compared: *, to the control group ($p < 0.01$); **, to patients with asthma ($p < 0.01$); ***, to patients with COPD ($p < 0.01$).

довательно, сочетаясь, ХОБЛ и БА являются взаимотягущими факторами, существенно модифицирующими классические пути развития системного воспаления и симптоматику заболевания.

Таким образом, суммируя исследования особенностей регуляции иммунного ответа при коморбидном течении ХОБЛ и БА [6, 7] и полученные новые данные о состоянии лейкоцитов, можно заключить, что хронический воспалительный процесс при сочетании этих двух патологий отягощается нарушением структуры липидома и функции митохондрий иммунокомпетентных клеток. Важную роль в прогрессировании патологического процесса играет развивающийся на фоне нарушения жирнокислотного состава цитомембраны лейкоцитов дисбаланс между про- и противовоспалительными, бронхоконстрикторными и бронходилатационными оксипиринами. Новые данные о роли ЖК мембран лейкоцитов в регуляции иммунного ответа вносят существенный вклад в изучение клеточно-молекулярных механизмов развития воспалительной реакции при заболеваниях бронхолегочной системы.

Заключение

Установленная модификация состава ЖК мембран лейкоцитов свидетельствует о важном значении ЖК и их метаболитов в иммунометаболических механизмах формирования системной воспалительной реакции при хронических заболеваниях органов дыхания. Нарушение архитектуры цитомембраны иммунных клеток обуславливает дисфункцию работы всей иммунной системы и является патогенетическим механизмом развития коморбидной патологии ХОБЛ и БА.

Конфликт интересов

У авторов рукописи нет конфликта интересов.

Выполнение анализа жирных кислот поддержано грантом Российского научного фонда (контракт 14-50-00034) для Н.В. Жуковой.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest. The analysis of fatty acids was supported by the Russian Research Foundation fellowship for Natal'ya V. Zhukova.

Литература

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated 2016. Available at: <http://www.doctorbeketov.ru/data/documents/GOLD-2016-EU-Global-Strategy.pdf>
2. Global Initiative for Asthma (GINA). Pocket Guide for Health Professionals. Updated 2016. Available at: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/05/WMS-GINA-2016-main-Pocket-Guide.pdf>
3. Tochino Y., Asai K., Shuto T., Hirata K. Asthma-COPD overlap syndrome-Coexistence of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in elderly patients and parameters for their differentiation. *J. Gen. Fam. Med.* 2017; 18 (1): 5–11.
4. Miravittles M., Alcazar B., Alvarez F.J. et al. What pulmonologists think about the asthma-COPD overlap syndrome. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015; 10 (1): 1321–1330. DOI: 10.2147/COPD.S88667.

5. Turner A.M., Tamasi L., Schleich F. et al. Clinically relevant subgroups in COPD and asthma. *Eur. Respir. Rev.* 2015; 24 (136): 283–298. DOI: 10.1183/16000617.00009014.
6. Kalinina E.P., Denisenko Y.K., Vitkina T.I. et al. The mechanisms of the regulation of immune response in patients with comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Can. Respir. J.* 2016; 2016: 4503267. DOI: 10.1155/2016/4503267.
7. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Кнышова В.В. и др. Особенности регуляции иммунного ответа у пациентов с коморбидным течением хронической обструктивной болезни легких и бронхиальной астмы. *Пульмонология.* 2014; (6): 5–10. DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-6-5-10.
8. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Жукова Н.В. и др. Ассоциация метаболизма жирных кислот с системной воспалительной реакцией при хронических заболеваниях органов дыхания. *Биомедицинская химия.* 2016; 62 (3): 341–347. DOI: 10.18097/PBMC20166203341.
9. Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Zhukova N.V. et al. Modification of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases. *Lipids Health Dis.* 2013; 12: 117. DOI: 10.1186/1476-511X-12-117.
10. Calder P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* 2017; 45 (5): 1105–1115. DOI: 10.1042/BST20160474.
11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37 (8): 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
12. Stransky K., Jursik T., Vitek A., Skorepa J. An improved method of characterizing fatty acids by equivalent chain length values. *J. High Resolut. Chrom.* 1992; 15 (11): 730–740. DOI: 10.1002/jhrc.1240151107.
13. Лобанова Е.Г., Кондратьева Е.В., Минеева Е.Е., Караман Ю.К. Мембранный потенциал митохондрий тромбоцитов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2014; 59 (6): 13–16.
14. Караман Ю.К., Лобанова Е.Г. Эндоканнабиноиды и эйкозаноиды: биосинтез, механизмы их взаимосвязи, роль в иммунных процессах. *Медицинская иммунология.* 2013; 15 (2): 119–130. DOI: 10.15789/1563-0625-2013-2-119-130.
15. Новгородцева Т.П., Денисенко Ю.К., Антонюк М.В. и др. Жирные кислоты крови в формировании и коррекции метаболического синдрома. *Терапевтический архив.* 2016; 88 (8): 30–34. DOI: 10.17116/terarkh201688830-34.
16. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Кондратьева Е.В. и др. Морфофункциональное состояние митохондрий клеток крови при бронхиальной астме. *Клиническая медицина.* 2015; 93 (10): 47–52.
17. Smith M.L., Murphy R.C. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. In: Vance D.E., Vance J.E., eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* The 4th Edition. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002: 341–371.

Поступила 11.09.18

References

1. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. Updated 2016. Available at: <http://www.doctorbeketov.ru/data/documents/GOLD-2016-EU-Global-Strategy.pdf>

2. Global Initiative for Asthma (GINA). Pocket Guide for Health Professionals. Updated 2016. Available at: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2016/05/WMS-GINA-2016-main-Pocket-Guide.pdf>
3. Tochino Y., Asai K., Shuto T., Hirata K. Asthma-COPD overlap syndrome-Coexistence of chronic obstructive pulmonary disease and asthma in elderly patients and parameters for their differentiation. *J. Gen. Fam. Med.* 2017; 18 (1): 5–11.
4. Miravitlles M., Alcazar B., Alvarez F.J. et al. What pulmonologists think about the asthma-COPD overlap syndrome. *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2015; 10 (1): 1321–1330. DOI: 10.2147/COPD.S88667.
5. Turner A.M., Tamasi L., Schleich F. et al. Clinically relevant subgroups in COPD and asthma. *Eur. Respir. Rev.* 2015; 24 (136): 283–298. DOI: 10.1183/16000617.00009014.
6. Kalinina E.P., Denisenko Y.K., Vitkina T.I. et al. The mechanisms of the regulation of immune response in patients with comorbidity of chronic obstructive pulmonary disease and asthma. *Can. Respir. J.* 2016; 2016: 4503267. DOI: 10.1155/2016/4503267.
7. Lobanova E.G., Kalinina E.P., Knyshova V.V. et al. Regulation of immune response in patients with COPD + asthma phenotype. *Pul'monologiya.* 2014; (6): 5–10. DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-6-5-10 (in Russian).
8. Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Zhukova N.V. et al. Association of fatty acid metabolism with systemic inflammatory response in chronic respiratory diseases. *Biomeditsinskaya khimiya.* 2016; 62 (3): 341–347. DOI: 10.18097/PBMC20166203341 (in Russian).
9. Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Zhukova N.V. et al. Modification of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases. *Lipids Health Dis.* 2013; 12: 117. DOI: 10.1186/1476-511X-12-117.
10. Calder P.C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* 2017; 45 (5): 1105–1115. DOI: 10.1042/BST20160474.
11. Bligh E.G., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1959; 37 (8): 911–917. DOI: 10.1139/o59-099.
12. Stransky K., Jursik T., Vitek A., Skorepa J. An improved method of characterizing fatty acids by equivalent chain length values. *J. High Resolut. Chrom.* 1992; 15 (11): 730–740. DOI: 10.1002/jhrc.1240151107.
13. Lobanova E.G., Kondrat'eva E.V., Mineeva E.E., Karaman Yu.K. The membrane potential of mitochondria of thrombocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2014; 59 (6): 13–16 (in Russian).
14. Karaman Yu.K., Lobanova E.G. Endocannabinoids and eicosanoids: biosynthesis and interactions with immune response. *Meditsinskaya immunologiya.* 2013; 15 (2): 119–130. DOI: 10.15789/1563-0625-2013-2-119-130 (in Russian).
15. Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V. et al. Blood fatty acids in the development and correction of metabolic syndrome. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2016; 88 (8): 30–34. DOI: 10.17116/terarkh201688830-34 (in Russian).
16. Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Kondrat'eva E.V. et al. Morpho-functional characteristics of blood cell mitochondria in bronchial asthma. *Klinicheskaya meditsina.* 2015; 93 (10): 47–52 (in Russian).
17. Smith M.L., Murphy R.C. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase and epoxygenase pathways. In: Vance D.E., Vance J.E., eds. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes.* The 4th Edition. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 2002: 341–371.

Received September 11, 2018



Уважаемые подписчики!

Обращаем Ваше внимание, что подписка на журнал «Ппульмонология» осуществляется по Объединенному каталогу «ПРЕССА РОССИИ».

Подписной индекс **для физических лиц – 73322**

Цена за 1 номер – **330 руб.**, за полугодие (3 номера) – **990 руб.**, за год (6 номеров) – **1 980 руб.**

Подписной индекс **для организаций – 80642**

Цена за 1 номер – **1 870 руб.**, за полугодие (3 номера) – **5 610 руб.**, за год (6 номеров) – **11 220 руб.**