

УДК 616.2: 577.125.33:611.018.1

ЗНАЧЕНИЕ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РАЗВИТИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ**Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Виткина Т.И., Гвозденко Т.А.,
Антонюк М.В., Ходосова К.К.***Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» – Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, Владивосток, e-mail: denisenko.imkvl@gmail.com*

Установление патогенетических механизмов развития бронхиальной астмы (БА) остается одной из актуальных проблем пульмонологии. Изучен состав жирных кислот (ЖК) и мембранный потенциал митохондрий (МПМ) клеток крови у больных контролируемой и частично контролируемой бронхиальной астмой. Состав ЖК мембран митохондрий в тромбоцитах исследовали методом газожидкостной хроматографии. МПМ лейкоцитов определяли методом проточной цитофлюориметрии с использованием реагента MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Life Technologies, USA). Установлена модификация состава ЖК, снижение мембранного потенциала мембран митохондрий клеток крови у лиц с БА. Выявлено усиление корреляционных взаимодействий между МПМ и основными семействами ЖК при прогрессировании заболевания, что свидетельствует о важном значении жирных кислот в развитии митохондриальной дисфункции в патогенезе БА.

Ключевые слова: бронхиальная астма, мембранный потенциал митохондрий, жирные кислоты**FATTY ACID VALUE IN DEVELOPMENT MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION IN ASTHMA****Denisenko Y.K., Novgorodtseva T.P., Vitkina T.I., Gvozdenko T.A.,
Antonuk M.V., Khodosova K.K.***Vladivostok Branch FGBNU «Far Eastern Scientific Centre of Physiology and Pathology of Respiration» – Scientific-Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok, e-mail: denisenko.imkvl@gmail.com*

Establishment of pathogenetic mechanisms of development of asthma is one of the urgent problems of pulmonology. We examined the composition of fatty acids (FA) and the mitochondrial membrane potential (MMP) of blood cells in patients with controlled and partially controlled asthma. The MMP of leukocytes was analyzed by flow cytometry with reagent MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Life Technologies, USA). The content of FA in mitochondrial membranes of platelets was analyzed by gas-liquid chromatography. The results of our study show that asthma is associated with the lowering of MMP and the modification of FA content of mitochondrial membranes in blood cells. Revealed increased correlation interactions between the MMP and the main families of the FF with the progression of the disease, which indicates the importance of fatty acids in the development of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of asthma.

Keywords: asthma, mitochondrial membrane potential, fatty acids

Бронхиальная астма (БА) остается одной из актуальных проблем пульмонологии, однако вопросы патогенетической основы данного заболевания продолжают дискутироваться [1]. В последнее время большой интерес сфокусирован на изучении митохондриальной активности при развитии респираторной патологии [2, 3, 6]. Установлена триггерная роль митохондрий в запуске процессов свободнорадикального окисления, механизмов апоптоза, развитии гипоксии при заболеваниях органов дыхания [2, 4, 6]. Остается открытым вопрос о детерминирующих сигнальных механизмах, запускающих развитие митохондриальной дисфункции.

Одним из маркеров митохондриальной активности и жизнеобеспеченности клеток является мембранный потенциал

митохондрий (МПМ) [4]. Считается, что включение этой органеллы в процесс программируемой клеточной гибели происходит после падения величины ее трансмембранного потенциала. Данный показатель снижается под влиянием самых разнообразных сигнальных стимулов (нарушения соотношения АДФ/АТФ, повышение уровня кальция в цитозоле, истощение глутатиона и др.). Увеличение проницаемости внешней и внутренней мембраны митохондрии является триггерным механизмом изменения МПМ. Следовательно, эффективное функционирование митохондрий связано с интегральной целостностью их структурных компонентов, важнейшими из которых являются жирные кислоты (ЖК). Основной пул ЖК преимущественно вовлечен в окислительные

энергетические процессы и поддержание мембранного гомеостаза митохондрий, что способствует нормальному функционированию всей клетки в целом [2, 7]. Однако литературных данных недостаточно чтобы говорить о роли ЖК в индукции митохондриальной дисфункции при патологии органов дыхания.

Исходя из вышеизложенного целью работы явилось изучение модификации состава жирных кислот, мембранного потенциала митохондрий клеток крови у больных контролируемой и частично контролируемой БА; установление роли жирных кислот в индукции митохондриальной дисфункции при БА.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 50 человек на условиях добровольного информированного согласия. Из них 20 пациентов с контролируемой бронхиальной астмой (первая группа), 10 больных с частично контролируемой БА (вторая группа), принимавших базисную терапию, в возрасте 23 – 57 лет ($37,4 \pm 2,36$ лет). Диагноз БА выставляли согласно Глобальной стратегии лечения и профилактики БА (GINA 2011) [1]. В контрольную группу вошли 20 здоровых добровольцев в возрасте 23 – 55 лет ($32,2 \pm 8,2$ лет), не курящих и никогда не куривших, без отягощенного аллергического анамнеза. 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.

Исследовали качественный и количественный состав ЖК мембран митохондрий в тромбоцитах. Митохондрии из клеток крови получали стандартным методом дифференциального центрифугирования в сахарозной среде. Анализ состава жирных кислот проводили методом газожидкостной хроматографии на газожидкостном хроматографе Shimadzu GC-2010 (Япония). Результаты выражали в процентах от общей суммы ЖК. Измерение мембранного потенциала митохондрий лейкоцитов производили с использованием реагента MitoProbe™ JC-1 Assay Kit (Life Technologies, USA). На проточном цитометре BD FACS CANTO II (BD Biosciences, USA) оценивали процентное содержание клеток со сниженным МПМ.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0. Проверку нормальности распределения признаков проводили с использованием критерия Колмогорова-Смирнова. Количественные признаки представлялись в виде среднего значения (M), стандартной ошибки среднего (m). Критерий Стьюдента использовался после проверки соблюдения условий равенства дисперсий групп сравнения по критерию Левена. Корреляционный анализ проводили по методу Пирсона. В таблице представлены только статистически значимые связи. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез $p = 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В составе ЖК мембран митохондрий обследованных групп выделено 39 индивидуальных жирных кислот насыщенных, моноеновых и полиненасыщенных, нормального и изостроения с длиной цепи от C_{12} до C_{24} , как с четным так и нечетным числом углеродных атомов. В табл. 1 представлены наиболее значимые жирные кислоты мембран митохондрий тромбоцитов больных БА.

Показано, что у пациентов первой группы в мембране митохондрий происходит истощение основного пула насыщенных жирных кислот (НЖК). Так, содержание лауриновой (12:0) и миристиновой (14:0) кислот снижалось в 1,3 раза по сравнению с группой контроля. Уровень стеариновой кислоты (18:0) уменьшался в 1,26 раза ($p < 0,001$). На фоне падения доли НЖК выявлено увеличение доли моноеновых жирных кислот (МНЖ): пальмитоолеиновой (16:1n-7) на 43% ($p < 0,001$) и олеиновой кислоты (18:1n-9) на 31% ($p < 0,001$). Известно, что для митохондрий основным источником энергии и предпочтительными для окисления являются короткоцепочечные 6:0-10:0, среднецепочечные 12:0-14:0 и длинноцепочечная 16:0 насыщенные жирные кислоты [5]. При недостатке вышеперечисленных жирных кислот митохондрии в качестве субстрата для β -окисления начинают использовать моноеновые кислоты и глюкозу. Возможно, накопление моноеновых кислот в митохондриальной мембране при БА – это проявление компенсаторной реакции в ответ на снижение доли среднецепочечных насыщенных кислот, поскольку олеиновая, пальмитоолеиновая кислоты являются следующими субстратами, которые митохондрии предпочитают окислять и для которых в митохондриях существуют все ферментные и транспортные системы [5]. Однако, снижение насыщенности митохондриальной мембраны всегда свидетельствует об энергодефиците клетки в целом [2].

Среди ПНЖК в мембране митохондрий пациентов первой группы отмечалось падение доли арахидоновой (20:4n-6) и эйкозапентаеновой (20:5n-3) кислот в 1,6 ($p < 0,001$) и 1,25 ($p < 0,05$) раза соответственно по сравнению с группой контроля. Уровень докозапентаеновой (22:5n-3) и докозатетраеновой (22:4n-6) кислот снижался у лиц с БА первой группы на 33% ($p < 0,001$) и 42% ($p < 0,01$) соответственно.

Таблица 1

Состав жирных кислот и мембранный потенциал мембран митохондрий клеток крови у пациентов с бронхиальной астмой ($M \pm m$)

Показатель, %	Контрольная группа, n = 20	Больные БА, n = 30	
		Первая группа (контролируемая БА), n = 20	Вторая группа (частично контролируемая БА), n = 10
Насыщенные жирные кислоты			
12:0	0,56 ± 0,05	0,43 ± 0,03**	
14:0	2,90 ± 0,16	2,19 ± 0,10***	3,92 ± 0,22***
16:0	28,25 ± 0,75	29,08 ± 0,94	29,69 ± 0,54
18:0	18,71 ± 0,33	14,75 ± 0,74***	21,38 ± 0,15*
20:0	0,69 ± 0,04	0,80 ± 0,04*	0,74 ± 0,07
22:0	0,92 ± 0,07	0,50 ± 0,05***	0,49 ± 0,05***
Мононенасыщенные жирные кислоты			
16:1n-9	1,65 ± 0,07	1,06 ± 0,10***	2,04 ± 0,24***
16:1n-7	1,68 ± 0,10	2,40 ± 0,15***	1,44 ± 0,11
18:1n-9	14,39 ± 0,43	18,82 ± 0,56***	18,89 ± 0,9***
18:1n-7	1,78 ± 0,07	1,65 ± 0,12	1,56 ± 0,13
Полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-6			
18:2n-6	9,56 ± 0,72	9,37 ± 0,62	13,43 ± 1,26***
18:3n-6	0,36 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,35 ± 0,08
20:3n-6	0,62 ± 0,06	0,44 ± 0,14	
20:4n-6	6,31 ± 0,44	3,87 ± 0,47***	2,56 ± 0,21***
22:4n-6	0,83 ± 0,09	0,48 ± 0,14**	0,59 ± 0,13***
22:5n-6	0,24 ± 0,04	0,20 ± 0,06	0,10 ± 0,01***
Полиненасыщенные жирные кислоты семейства n-3			
18:3n-3	0,51 ± 0,04	0,53 ± 0,04	0,32 ± 0,03***
20:5n-3	0,80 ± 0,07	0,64 ± 0,06*	0,31 ± 0,02***
22:5n-3	0,67 ± 0,06	0,45 ± 0,04***	0,26 ± 0,06***
22:6n-3	1,45 ± 0,13	1,45 ± 0,20	0,62 ± 0,06***
Мембранный потенциал митохондрий			
МПМ	5,20% ± 0,07	13,00 ± 0,03	14,50 ± 0,01

Примечание: (*) – статистическая значимость различий относительно контрольной группы; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$.

Анализ модификации состава жирных кислот мембран митохондрий больных БА второй группы выявил увеличение доли 14:0, 18:0, 16:1n-9, как по сравнению с контрольной группой, так и относительно первой группы пациентов. Во второй группе больных БА, так же как и в первой группе показано снижение доли 22:0 и увеличение содержания 18:1n-9. Состав ПНЖК семейства n-6 у больных второй группы характеризовался уменьшением уровня 20:4n-6 (в 2,5 раза, $p < 0,001$), 22:4n-6 (1,4 раза, $p < 0,001$), 22:5n-6 (2,4 раза, $p < 0,001$). Исключение показано только для 18:2n-6, количество которой достоверно повышалось относительно группы контроля в 1,4 раза ($p < 0,001$). Аналогичная картина выявля-

на и в содержании ПНЖК семейства n-3 – это падение доли 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3, 22:6n-3, относительно пациентов контрольной и первой групп.

Полученные результаты свидетельствуют о модификации состава ЖК мембран митохондрий у больных БА не зависимо от тяжести течения. Однако выраженность и направленность этих изменений имела свои особенности. Так, при БА контролируемого течения в мембране митохондрий выявлено истощение уровня большинства насыщенных ЖК (12:0, 14:0, 18:0, 22:0) и некоторых полиненасыщенных ЖК (20:4n-6, 22:4n-6, 20:5n-3, 22:5n-3). Особенностью модификации состава ЖК мембран митохондрий тромбоцитов больных

частично контролируемого течения БА стал выраженный дефицит ПНЖК в ряду n-3 и n-6 семейств на фоне накопления насыщенных (14:0, 18:0) и моноеновых (16:1n-9, 18:1n-9) кислот.

Одной из причин дефицита ПНЖК является интенсивное их расходование на синтез биологически активных медиаторов – эйкозаноидов, оказывающих мощный провоспалительный и бронхоконстрикторный эффект. Многочисленными исследованиями показано, что при БА гиперсекреция лейкотриена, тромбоксана и простагландина обуславливает уменьшение уровня их предшественников в цитомембране [7]. Нами впервые показано, что и мембрана митохондрий подвергается существенной реорганизации, что возможно, и обуславливает сложный механизм патогенеза БА. С утяжелением заболевания увеличение дефицита ПНЖК в мембране митохондрий

является логичным явлением, поскольку при частично контролируемой БА усложняется фармакологический контроль за регуляцией иммунных механизмов, в том числе и синтезом эйкозаноидов.

Выявленное нарушение состава ЖК мембран митохондрий может обуславливать неспособность митохондрий поддерживать электрохимический градиент ионов водорода на внутренней мембране, с потерей способности эффективно осуществлять окислительное фосфорилирование, производство АТФ и сбалансированный митохондриальный Ca^{2+} ионный гомеостаз [5, 6].

Для подтверждения вышесказанного предположения о роли жирных кислот в нарушении энергетической функции клетки был исследован мембранный потенциал митохондрий и проведен корреляционный анализ между МПМ и составом ЖК митохондрий у больных БА.

Таблица 2

Корреляционные связи между жирными кислотами и мембранным потенциалом митохондрий

ЖК	Контрольная группа	Первая группа (контролируемая БА)	Вторая группа (частично контролируемая БА)
	МПМ	МПМ	МПМ
12:0		0,40	
14:0		0,62	-0,51
16:0	0,25	-0,36	
18:0			-0,87
20:0			-0,92
22:0	-0,90		-0,95
Среднее значение корреляционных связей НЖК	0,58	0,46	0,81
16:1n-9	-0,24	0,39	-0,66
16:1n-7		0,36	-0,91
18:1n-9	0,68	-0,39	
18:1n-7	-0,37	0,37	0,60
Среднее значение корреляционных связей МЖК	0,43	0,38	0,73
18:2n-6		-0,54	0,95
18:3n-6	-0,74		0,57
20:3n-6	0,43		
20:4n-6	-0,37	0,61	
22:4n-6			
22:5n-6		0,59	
Среднее значение корреляционных связей n-6 ПНЖК	0,50	0,61	0,76
18:3n-3	0,43	-0,79	
20:5n-3		0,52	
22:5n-3	0,41		
22:6n-3			0,94
Среднее значение корреляционных связей n-3 ПНЖК	0,44	0,64	0,94
Среднее значение корреляционных связей	0,47	0,55	0,85

Оценка содержания лейкоцитов со сниженным МПМ в исследуемых группах выявила значительное повышение данного показателя у лиц с БА (табл. 1). В группе больных БА контролируемого течения доля клеток со сниженным МПМ составила 13% ($p < 0,001$), что в 2,5 раза выше относительно контрольной группы (здоровые лица – 5,2%). У пациентов второй группы значение МПМ было в 2,8 раза выше группы здоровых пациентов и составило 14,5% ($p < 0,001$). Выявленное увеличение количества лейкоцитов со сниженным МПМ у лиц с БА независимо от тяжести течения свидетельствует об уменьшении энергообеспечения клетки, кислородном голодании и активации апоптотических механизмов клеток иммунной системы.

Анализ корреляционных взаимодействий между МПМ и ЖК представлен в табл. 2. У обследуемых контрольной группы наблюдалось равномерное распределение корреляционных взаимоотношений между МПМ и исследуемыми семействами ЖК (НЖК, МЖК, n-6 и n-3 ПНЖК), что подтверждается относительно однородными показателями среднего значения корреляционных связей (СЗКС). Выявленные данные свидетельствуют об одинаково значимом влиянии НЖК, МЖК, ПНЖК на энергетическую активность митохондрий. Баланс между НЖК, МНЖ, ПНЖК в липидном каркасе обеспечивает сохранение структурного состояния внутриклеточной мембраны и поддержание энергетической функции митохондрий.

При контролируемой БА происходит смещение равновесия в сторону усиления корреляционных взаимодействий между МПМ и ПНЖК (СЗКС n-6 ПНЖК/МПМ – 0,61; СЗКС n-3 ПНЖК/МПМ – 0,64). С утяжелением заболевания (частично контролируемая БА) количество связей между МПМ и показателями всех семейств ЖК увеличивается, а интенсивность этой интеграции усиливается. Усиление корреляционного взаимодействия между функциональными (МПМ) и структурными (ЖК) параметрами свидетельствует о повышении сопряжения с внутриклеточными процессами, функционировании митохондрий в условиях сильного напряжения и нарушении гомеостаза. Приоритетную роль в наруше-

нии энергетической функции клетки играют НЖК и n-3 ПНЖК. Формирующийся дисбаланс в соотношении ЖК в мембране митохондрий у больных БА, характеризующийся дефицитом большинства насыщенных и полиненасыщенных ЖК приводит к нарушению энергетической функции клетки, запуску апоптотических процессов.

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о важной роли жирных кислот в развитии митохондриальной дисфункции в патогенезе БА. Выявленные изменения в структурно-функциональном состоянии митохондрий у лиц с БА свидетельствуют о нарушении энергетической активности, мембранной проницаемости и транспорта веществ, что является признаком формирования митохондриальной дисфункции.

Можно заключить, что характеристики и параметры митохондриального аппарата клетки представляют собой перспективный объект изучения, являющийся тонким показателем внешних и внутренних воздействий и изменений в организме.

Список литературы

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы (пересмотр 2014 года). Под ред. А.С. Бельского. – М: Рос. респираторное общество, 2015. – 148 с.
2. Денисенко Ю.К., Виткина Т.И., Новгородцева Т.П., Кондратьева Е.В., Жукова Н.В., Боршев П.В. Спектр жирных кислот мембран митохондрий тромбоцитов больных хроническим необструктивным бронхитом // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2013. – № 50. – С. 34-38.
3. Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Кондратьева Е.В., Жукова Н.В., Антониюк М.В., Кнышова В.В., Минеева Е.Е. Морфофункциональное состояние митохондрий клеток крови при бронхиальной астме // Клиническая медицина. – 2015. – № 10. – С. 47-52.
4. 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. – № 6. – С. 13-16.
5. Титов В.Н. Функция митохондрий, карнитин, коэнзим-А, жирные кислоты, глюкоза, цикл Рендла и инсулин (лекция). Клини. лаб. диагностика. 2012; 2: 32-42.
6. Aravamudan B., Thompson M.A., Pabelick C.M., Prakash Y.S. Mitochondria in Lung Diseases. Expert Rev Respir Med. 2013; 7(6): 631–646. doi: 10.1586/17476348.2013.834252.
7. Novgorodtseva T.P., Denisenko Yu.K., Zhukova N.V., Antonyuk M.V., Knyshova V.V. Gvozdenko T.A. Modification of the fatty acid composition of the erythrocyte membrane in patients with chronic respiratory diseases // Lipids in Health and Disease. 2013, 12:117.