

**Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Рязанский государственный медицинский университет  
имени академика И.П. Павлова»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**Бельских Эдуард Сергеевич**

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

14.01.04 – внутренние болезни

Диссертация на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:  
доктор медицинских наук, профессор  
Урясьев Олег Михайлович  
Научный консультант:  
кандидат биологических наук, доцент  
Звягина Валентина Ивановна

Рязань – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	13
1.1. Хроническая обструктивная болезнь легких как глобальная медико-социальная проблема.....	13
1.2. Современные представления о патогенезе ХОБЛ.....	22
1.3. Функционирование митохондрий в норме и при патологии.....	31
1.4. Характеристика показателей митохондриальной дисфункции, изучаемых в диссертационном исследовании.....	38
1.4.1. Окислительно-модифицированные белки.....	38
1.4.2. Сукцинатдегидрогеназа.....	42
1.4.3. Сукцинат.....	44
1.4.4. Супероксиддисмутаза.....	46
1.4.5. Мембранный потенциал как маркер митохондриальной дисфункции.....	47
1.5. Перспективы митохондриально-ориентированной терапии ХОБЛ.....	49
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	55
2.1. Общая характеристика исследования.....	55
2.2. Клиническая характеристика исследуемых групп.....	57
2.3. Характеристика клинических и лабораторных методов исследования.....	65
2.3.1. Определение биохимических показателей функционирования митохондрий.....	65
2.3.2. Определение мембранного потенциала митохондрий методом проточной цитофлуориметрии.....	67
2.4. Статистическая обработка полученных результатов.....	71
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	73
3.1. Изменение показателей митохондриальной функции мононуклеарных лейкоцитов у больных ХОБЛ.....	73
3.2. Оценка взаимосвязи нарушений функционирования митохондрий моноядерных лейкоцитов у больных ХОБЛ с выраженностью бронхообструкции.....	78

3.3. Изменение выраженности показателей митохондриальной дисфункции у больных ХОБЛ в зависимости от выраженности симптомов и частоты обострений .....	87
3.4. Изучение особенностей маркеров митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови при обострении ХОБЛ у больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями .....	92
3.5. Определение значения отказа от курения для митохондриальных нарушений моноядерных лейкоцитов крови у больных при обострении ХОБЛ .....	97
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ</b> .....	101
<b>ВЫВОДЫ</b> .....	110
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ</b> .....	111
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	112
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	114

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) в настоящее время является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире [7,110,141]. В настоящее время в ходе лечения ХОБЛ можно добиться уменьшения симптомов, частоты и тяжести обострений, увеличить толерантность к физической нагрузке [30,111]. Однако на сегодняшний день нет убедительных доказательств, что какой-либо из существующих лекарственных препаратов для терапии ХОБЛ позволяет остановить прогрессирующее снижение функции легких в долгосрочной перспективе [86,111,143]. Таким образом, прогрессирующий характер заболевания, а также рост заболеваемости ХОБЛ, связанный со старением населения, постоянно увеличивает социальное и экономическое бремя ХОБЛ [30,143,190]. Это обуславливает важность изучения патогенетических аспектов заболевания, которые могут быть использованы для персонализированного подхода и оптимизации терапии ХОБЛ [47,71].

Среди различных патогенетических аспектов воспаления при ХОБЛ в GOLD выделяется роль окислительного стресса, модифицирующего воспалительный процесс в легких, подчеркивается его взаимосвязь с обострением заболевания [111]. Окислительный стресс (ОС) – процесс, связанный с образованием избыточного количества активных форм кислорода [138,196]. Развитие ОС всегда взаимосвязано с функционированием митохондрий - органелл, использующих кислород в процессе клеточного дыхания, которые выполняют не только энергетические, но и регуляторные функции, в том числе опосредуют процессы апоптоза [115,138,196].

В связи с этим одним из перспективных направлений в изучении причин усиления воспалительного ответа и прогрессирующего характера заболевания является изучение выраженности митохондриальной дисфункции при ХОБЛ [40,62,129].

Установлено, что у пациентов с ХОБЛ хроническое воздействие сигаретного дыма способствует развитию митохондриальной дисфункции, определяемой в клетках тканей легких и скелетной мускулатуры, что позволяет предположить системный характер нарушений и возможность определения его выраженности в лейкоцитах крови [108,235,236]. Одним из ключевых проявлений митохондриальной дисфункции является открытие митохондриальной поры проницаемости, что запускает и поддерживает в эпителиальных и гладкомышечных клетках процессы, ведущие к апоптозу, итогом которого становятся развитие хронической воспалительной реакции и ремоделирование бронхиальной стенки [62,74,235]. Системный характер изменений в митохондриях при ХОБЛ, тесная взаимосвязь между дыхательной функцией легких и процессами энергообразования в митохондриях обуславливает важность изучения маркеров митохондриальной дисфункции у больных ХОБЛ [138,149,185].

Стоит отметить, что под ХОБЛ в настоящее время понимают достаточно широкий комплекс гетерогенных синдромов с легочными и внелегочными проявлениями [62,71,149,235]. При этом считается, что стандартных спирометрических показателей, используемых для диагностики, недостаточно для описания и классификации пациентов с ХОБЛ [47,137,180]. Поэтому для оптимального выбора стратегии лечения пациентов предпринимаются попытки выделять отдельные подгруппы в соответствии с прогнозом и ответом на терапию – фенотипы [30,111,116]. Несмотря на то, что в настоящее время нет единой принятой классификации фенотипов ХОБЛ, в большинстве новых предлагаемых вариантов среди ключевых классификационных критериев подчеркивается частота обострений и наличие изменений анатомической структуры легких, таких как эмфизема или бронхоэктазии [30,111,116]. Исследование показателей митохондриальной дисфункции у больных ХОБЛ с различной выраженностью симптомов, частотой обострений в анамнезе, наличием изменений структуры легких могло бы стать дополнительным критерием для определения фенотипа заболевания [81,108,171].

В настоящее время в клинической практике для оценки функционального состояния митохондрий используются молекулярно-генетические методы, а также широко применяются биохимические исследования: измерение активности митохондриальных ферментов и концентрации их субстратов, определение уровня продуктов свободнорадикального окисления в крови [102,140,163]. Среди подходов, применяемых для оценки биоэнергетических процессов митохондрий, весьма информативным является измерение митохондриального мембранного потенциала [49,53,149,152]. Уменьшение уровня разности потенциалов внутренней мембраны митохондрий указывает на развитие дисфункционального состояния митохондрий, и может служить одним из основных показателей инициации митохондриального пути апоптоза. Большое значение при проведении исследований в клинической практике имеет выбор малоинвазивных способов диагностики [13,18,19,31]. Так, наиболее удобным объектом для исследования функционирования митохондрий являются моноядерные лейкоциты периферической крови, которые, по многочисленным литературным источникам, способны отражать системные изменения, протекающие в организме.

Исходя из вышесказанного, представляется целесообразным изучение степени выраженности митохондриальной дисфункции и её взаимосвязи с нарушением функции легких у больных ХОБЛ с различными клиническими фенотипами, так как полученные данные помогут существенно расширить представления о патогенезе заболевания и будут полезны при разработке митохондриально-ориентированной терапии.

### **Степень разработанности темы**

Наличие окислительного стресса в патогенезе ХОБЛ установлено уже более двух десятилетий назад [197]. Благодаря активным исследованиям, посвященным молекулярным механизмам окислительного повреждения был установлен его вклад в клинические проявления заболевания, такие как резистентность к ИГКС, связанная с инактивацией деацетилазы гистонов, и поддержание хронического воспаления в стенке бронхов [63]. Открытие сигнальной роли активных форм

кислорода и сигнальной функции митохондрий клеток различных тканей создало предпосылки для изучения вклада митохондриальной дисфункции в патогенез ХОБЛ, как клеточной структуры не только повреждающейся под действием АФК, но и самостоятельно способной поддерживать избыточный уровень генерации АФК, сопровождающийся окислительным стрессом [69,115]. Благодаря исследовательской работе С.Н. Wiegman et al., опубликованной в 2015 году, впервые были сопоставлены процессы развития митохондриальной дисфункции у животных, курильщиков и пациентов с ХОБЛ [171]. В рамках исследования также впервые была продемонстрирована возможность коррекции нарушения функций митохондрий с помощью митохондриально ориентированных антиоксидантов. Важно отметить, что коррекция вторичной митохондриальной дисфункции, приводило не только к нормализации биохимических показателей, но и сопровождалось разрешением воспалительной реакции и гиперреактивности бронхов [40].

Исследование клеточных культур крайне затруднительно в условиях клинической практики, поэтому исследование клеток крови для оценки митохондриальной дисфункции, по мнению ряда исследователей, является более доступными [13,18,19,31]. В связи с этим отечественными учеными были проведены пилотные исследования, продемонстрировавшие возможность выявления митохондриальной дисфункции с помощью катионных красителей методом проточной цитофлуориметрии [13,18,19]. При этом наиболее выраженные изменения были получены при исследовании мембранного потенциала моноядерных лейкоцитов у детей с пневмонией [18]. В целом исследования последних лет указывают, что мембранный потенциал митохондрий, определяемый с помощью катионных красителей, может стать новым биомаркером митохондриальной дисфункции наряду с уровнем митохондриальной ДНК и потреблением кислорода [13,18,19,31,153].

Выявление специфических реакций митохондрий клеток тканей легкого, мышц или крови в виде изменения показателей метаболизма митохондрий, клеточного дыхания и окислительного стресса, специфических сигнальных белков

или маркеров апоптоза способно объективизировать адаптационный резерв или дезадаптивные изменения в клетках при различных проявлениях заболевания [108,142]. При этом, в настоящее время рядом исследователей митохондриальная дисфункция мононуклеаров периферической крови рассматривается как возможный предиктор адаптивных реакций всего организма [13,18,19,207].

Таким образом, в настоящее время продолжается активное изучение различных патофизиологических механизмов ХОБЛ в формировании эндотипов заболевания, что может стать основой для выявления новых потенциальных биомаркеров и терапевтических мишеней, которые могут быть использованы для уточнения прогноза и подбора индивидуализированной терапии [48,143]. Учитывая результаты исследований, полученных на животных моделях и клеточных культурах, демонстрирующих тесную связь между функционированием митохондрий клеток различных тканей и основными патогенетическими механизмами ХОБЛ, а так же потенциальную пользу от коррекции нарушения функций митохондрий, представляется актуальным исследование клинического значения биомаркеров системной вторичной митохондриальной дисфункции у больных с ХОБЛ.

### **Цель исследования**

Дать характеристику вторичной митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови и оценить её взаимосвязь с основными клинико-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**

- 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 (28-29 ноября 2018 года, Рязань), XIII Национальном конгрессе терапевтов (21-23 ноября 2018 года, г. Москва), IV

Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (11-12 октября 2018 года, г. Рязань), 11-й Международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук – основа формирования современной медицины» (12-14 сентября 2018 года, Астрахань), XXIV ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины -2018» (12-13 апреля 2018 года, Санкт-Петербург), X Юбилейной Российской научно-практической конференции с международным участием «Здоровье человека в XXI веке» (30-31 марта 2018 года, Казань).

### **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.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 3 – в журналах, включенных Высшей аттестационной комиссией Минобрнауки России в перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, 1 публикация в Scopus-индексируемом издании.

### **Личный вклад автора**

Все результаты диссертационного исследования получены автором самостоятельно или при непосредственном участии: набор пациентов и добровольцев в исследование, клиническое обследование, функциональные и лабораторные исследования, статистическая обработка полученных данных. Формулировка целей и задач, интерпретация результатов работы проводилась совместно с научным руководителем и научным консультантом.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Хроническая обструктивная болезнь легких как глобальная медико-социальная проблема

Хронические бронхолегочные заболевания в настоящее время являются актуальной проблемой здравоохранения, что связано с их распространенностью, прогрессирующим течением и инвалидизирующим характером [7]. Занимая первое место в структуре общей заболеваемости в Российской Федерации, хронические бронхолегочные заболевания представляют собой значительное медико-социальное и экономическое бремя [30,32].

Среди всех хронических бронхолегочных заболеваний особое значение имеет хроническая обструктивная болезнь легких (далее – ХОБЛ), которая согласно данным ВОЗ в настоящее время входит в пять ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире [222].

Согласно определению «Глобальной стратегии диагностики, лечения и профилактики хронической обструктивной болезни легких» - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) - ХОБЛ является заболеванием, «которое можно предупредить и лечить, характеризующееся постоянными респираторными симптомами и ограничением воздушного потока, вызванными дыхательными и / или альвеолярными нарушениями, обычно вызванными значительным воздействием вредных частиц или газов» [111].

Предполагается, что распространенность и социально-экономическое бремя заболевания продолжит увеличиваться в ближайшее десятилетие как из-за подверженности факторам риска ХОБЛ значительной части популяции, так из-за старения населения в целом [141,159].

Данные прогнозы подтверждаются результатами исследований, посвященных эпидемиологии ХОБЛ [110]. По данным D. Adeloye et al. во всем мире с 1990 по 2010 годы отмечается увеличение количества случаев заболевания ХОБЛ среди населения старше 30 лет на 68,9%. Среди городского населения прирост заболеваемости в 2,02 раза больше, чем среди сельского населения [32]. По

результатам эпидемиологических исследований с 2005 до 2012 года в России также наблюдается прирост показателя заболеваемости ХОБЛ на 27,16%, увеличившись с 525,6 до 668,4 на 100 тыс. населения. По источникам Министерства здравоохранения Российской Федерации среди всех причин смертности от хронических неинфекционных заболеваний ХОБЛ занимает 4-е место [30]. Преобладание лиц трудоспособного возраста в возрастной структуре больных ХОБЛ, их высокий процент выхода на инвалидность определяют высокую медико-социальную значимость для системы здравоохранения [30,32]. Только в 2013 году бремя ХОБЛ было оценено Фондом «Качество жизни» в рамках проекта «Социально-экономические потери от бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации» более чем в 24 млрд. рублей, что почти в 2 раза превышало затраты на бремя, связанное с бронхиальной астмой [21].

Таким образом, ХОБЛ в настоящее время представляет собой один из крупнейших вызовов для здравоохранения, оставаясь одним из самых распространенных хронических воспалительных заболеваний легких, которое характеризуется прогрессирующим приростом заболеваемости и увеличением частоты смертности во всем мире [17,111,159]. Для борьбы с бременем ХОБЛ в 1998 году было положено начало программе GOLD.

В настоящее время в соответствии с положениями GOLD для подтверждения ХОБЛ определяющее значение имеет спирометрический критерий персистирующего ограничения воздушного потока, определяемый как постбронходилатационный показатель  $ОФВ_1/ФЖЕЛ < 0,7$  (модифицированный индекс Тиффно) [30,111]. Однако отсутствие специфических симптомов при использовании спирометрии для установления диагноза создает ограничения, приводящие к гипердиагностике ХОБЛ у пожилых пациентов, имеющих тенденцию к снижению  $ОФВ_1/ФЖЕЛ$  вследствие уменьшения жизненной емкости легких (ЖЕЛ) с возрастом и к гиподиагностике у молодых пациентов (<45 лет) [4].

По результатам исследования NHANES III D.M. Mannino указывает, что спирометрия позволила выявить нарушение функции легких у 6,8% исследованных

пациентов. Более половины из них (63,3%) никогда ранее не имели диагностированного обструктивного заболевания легких [166]. Данные исследований BOLD, PLATINO, EPI-SCAN и PREPOCOL, суммированные Lamprecht et al., также показали, что 81,4% пациентов с ХОБЛ, у которых был установлен диагноз с помощью спирометрии, ранее диагноза ХОБЛ не имели [90].

В своей работе S.R. Santos подчеркивает, что проблемы гиподиагностики ХОБЛ связаны также с особенностью течения заболевания. Из-за медленного прогрессирования пациенты с недиагностированной ХОБЛ хронический кашель с выделением мокроты часто объясняют курением, а одышку при физической нагрузке – потерей физической формы или старением [230]. В свою очередь, как указывает M. Decramer et al., отложенная диагностика ХОБЛ способствует прогрессированию необратимых морфологических изменений в тканях легких, что ухудшает прогноз и сокращает возможности для реабилитации пациентов [88]. Актуальность поиска способов улучшения диагностики подтверждается сообщением E. Valcells et al. о том, что у трети пациентов, впервые госпитализированных с обострением, ХОБЛ не была диагностирована до момента госпитализации [70].

Наряду с установлением диагноза до настоящего времени в клинической практике остается актуальной проблема оценки тяжести больных с ХОБЛ [6,25]. Начиная с внедрения программы GOLD, тяжесть заболевания у пациентов оценивалась по выраженности бронхообструкции, определяемой по снижению спирометрического показателя  $ОФВ_1$  относительно рассчитанных должных величин. В настоящее время этот критерий продолжает использоваться, подтверждена его важность для прогнозирования клинических исходов на уровне популяции. Однако использование только спирометрической классификации степени ограничения воздушного потока приводит к завышению тяжести ХОБЛ в популяциях пожилых больных и занижению среди молодых, так как связь между  $ОФВ_1$  и симптомами ХОБЛ слабая [4].

Сведения о скорости снижения функции легких у больных с ХОБЛ, определяемые по показателю  $ОФВ_1$ , неоднородны. Среди работ есть те, в которых

указано на большую скорость снижения легочной функции у пациентов с ХОБЛ на ранних стадиях [39]. В другом недавнем клиническом исследовании, проведенном на субъектах со средним возрастом около 60 лет, была отмечена большая скорость снижения легочной функции у пациентов с исходно более легкой обструкцией дыхательных путей [136].

С другой стороны, в результатах исследования, проведенного у пациентов со средним возрастом около 50 лет, было обнаружено большее снижение легочной функции у пациентов с тяжелой обструкцией [199]. Данные результаты демонстрируют, что ухудшение легочной функции у пациентов с ХОБЛ со временем может быть неодинаковым. По результатам недавней работы P. Lange et al. сообщает, что развитие ХОБЛ не всегда определяется быстрым снижением  $ОФВ_1$ , но отмечает, что низкие показатели  $ОФВ_1$  в молодом возрасте в большей степени связаны с прогрессированием ХОБЛ вследствие курения [137].

В связи с очевидной недостаточностью одних лишь спирометрических критериев для улучшения ведения больных с ХОБЛ в 2011 году был введен новый метод оценки тяжести ХОБЛ, основанный на комбинации факторов: уровень симптомов у пациента, частота обострений и тяжесть спирометрических нарушений. Для оценки симптомов GOLD рекомендует использовать модифицированный вопросник Британского совета по медицинским исследованиям (mMRC) и тест оценки ХОБЛ (CAT) [92]. Хотя в вопроснике mMRC оценивается только тяжесть одышки, использование CAT позволяет оценивать другие показатели состояния здоровья и прогнозировать риск смертности в будущем лучше, чем ограничение воздушного потока [165].

Предполагается, что комбинированная оценка ХОБЛ путем классификации заболевания по категориям от А до D обеспечивает лучшую диагностическую классификацию, поскольку она идентифицирует больше людей с высоким риском обострений, чем классификация, основанная исключительно на спирометрических критериях. Вопреки ожиданиям, после анализа результатов использования комбинированной оценки оказалось, что госпитализация из-за ХОБЛ или по всем причинам была выше в группе В, чем в группе С [215]. Более того, выживаемость

в группе С (высокий риск, плохая функция легких и небольшое количество симптомов) с более тяжелой ХОБЛ была выше, чем в группе В (низкий риск, лучшая функция легких, большее количество симптомов) с менее тяжелой ХОБЛ [215]. М. Karloh объясняет это тем, что больные группы С и D крайне разнородны и состоят из фенотипов с переменным риском обострений или смерти [215]. В своей работе D.M. Mannino, указывает, что пациенты с ХОБЛ часто имеют различные сопутствующие заболевания, такие как ССЗ, саркопению, метаболический синдром, остеопороз, депрессию и рак легких. Эти коморбидные заболевания могут возникать у пациентов с легким, умеренным или серьезным ограничением воздушного потока и влиять на частоту госпитализации и показатели смертности [181]. По мнению P. Lange et al. несоответствие между группами В и С, скорее всего, вызвано неоднородным распределением сопутствующих заболеваний, в частности сердечно-сосудистых заболеваний [180]. Кроме того, худший прогноз может быть обусловлен коморбидными сердечно-сосудистыми заболеваниями или злокачественными опухолями. Данная особенность ХОБЛ была подтверждена в долгосрочном исследовании в Национальном проспективном регистре ХОБЛ Германии [212].

Начиная с GOLD 2017 года, в связи с накоплением информации о неточности прогноза летальности и других исходов ХОБЛ при использовании комбинированной оценки, спирометрические показатели были исключены из общего алгоритма выбора фармакотерапии. В случае несоответствия между уровнем функциональных нарушений и выраженностью симптомов в настоящее время рекомендуется проведение дополнительных обследований для выявления сопутствующих заболеваний, которые могут оказывать влияние на симптомы заболевания. Для подтверждения адаптации больных ХОБЛ к тяжелой степени бронхообструкции, что сопровождается уменьшением жалоб на одышку, рекомендовано проведение нагрузочных тестов для определения интенсивности проводимой терапии [30,111,4].

Таким образом, коморбидный статус, в значительной мере определяющий прогноз основного заболевания, не учитывается в рамках комбинированной оценки

ХОБЛ в диагностике GOLD, несмотря на то, что в соответствии с GOLD необходимо уделять внимание сопутствующим заболеваниям, регулярно диагностировать их и правильно их лечить [30,111].

В связи со значительной гетерогенностью больных ХОБЛ, для выделения подгрупп больных отличных по терапевтическому подходу и прогнозу в настоящее время предпринимаются попытки выделять фенотипы ХОБЛ с целью индивидуализации лечения и определения вероятного прогноза, например: ХОБЛ у некурящих, ХОБЛ у женщин, ХОБЛ с пневмосклерозом [1,16,25,71,116,128].

Под фенотипом ХОБЛ, в соответствии с K. Han MeiLan et al., принято понимать «единственный отличительный признак заболевания или их комбинацию, которые характеризуют клинические проявления и связаны со значимыми исходами заболевания, такими как симптомы, обострения, ответ на терапию, скорость прогрессирования заболевания или смерть» [73].

Исторически среди первых фенотипов больных с ХОБЛ выделяли бронхитический фенотип («синие отечники») и эмфизематозный фенотип («розовые пыхельщики») [72]. «Розовые пыхельщики» имеют характерный розовый цвет лица, и в клинике их заболевания преобладает одышка. Такие больные характеризуются преобладанием рестриктивных нарушений функции легких, дисбалансом между потребностью и потреблением энергии, что зачастую приводит к снижению веса. Уровень  $PaO_2$  артериальной крови у них, как правило, в норме, а уровень  $PaCO_2$  может быть снижен. Для больных с бронхитическим фенотипом характерен цианоз и симптомы сердечной недостаточности. Емкость легких у таких больных может быть в норме или снижена. При сохранении диффузионной способности легких для них характерно снижение  $PaO_2$  и увеличение  $PaCO_2$  в артериальной крови. «Синие отечники», как правило, имеют избыточный вес. Характерные проявления, которые позволяют отнести больного к бронхитическому или эмфизематозному фенотипу, развиваются достаточно поздно, при этом чаще встречаются больные со смешанным типом заболевания, сочетающим симптомы обоих фенотипов [30].

По итогам клинического исследования «Оценка ХОБЛ в продольном направлении для определения прогнозируемых суррогатных конечных точек» (ECLIPSE) сообщается о наличии фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями, к которому относятся пациенты с двумя или более обострениями ХОБЛ в год [208].

Обострения ХОБЛ - это острые явления, характеризующиеся ухудшением респираторных симптомов у пациента до уровней, которые ниже нормальных изменений, а ухудшение состояния требует изменения текущей терапии [68].

Обострения являются серьезными событиями в клиническом течении ХОБЛ из-за их негативного влияния на симптомы и функцию легких, а выздоровление пациента после обострения занимает несколько недель и ухудшает качество жизни пациента [37,223]. Кроме того, обострения ускоряют скорость снижения функции легких и связаны со значительной смертностью, особенно у пациентов, которым требуется госпитализация [187]. При этом стоит отметить, что воспалительный процесс у пациентов с ХОБЛ проявляется в значительной степени неоднородно, что определяет эффективность и целесообразность антибактериальной терапии только у части пациентов [234]. В этой связи принято выделять два фенотипа обострения воспалительного процесса.

I тип обострения – инфекционный фенотип – связан с усилением проявлений воспалительного синдрома: наблюдается повышение температуры тела, увеличение количества мокроты, усиление её «гнойности», в крови отмечается лейкоцитоз, прирост СОЭ и уровней альфа2-глобулинов, С-реактивного белка. Принято считать, что воспаление 1-го типа играет важную роль в патогенезе эмфиземы [56].

II тип обострения называется неинфекционным и характеризуется усилением одышки и внелегочных проявлений ХОБЛ [30].

До настоящего времени показатели, предопределяющие частоту обострений ХОБЛ, изучены недостаточно, хотя они являются ключевыми событиями в развитии ХОБЛ, так как могут привести к госпитализации или смерти и тесно связаны с качеством жизни пациента.

Используя большую группу наблюдений, исследование ECLIPSE показало, что развитие обострений ХОБЛ в значительной мере не зависит от показателей спирометрии. Проспективно собранные данные из крупных клинических исследований, таких как ECLIPSE, UPLIFT и TORCH, указывают на повышенный риск обострений и смерти между различными уровнями тяжести ХОБЛ, определяемой по спирометрической классификации [98,99,208]. Однако, эти данные не могут быть использованы для точной оценки и не относятся к каждому пациенту, что так же указывает на неоднородность популяции больных с ХОБЛ. Поэтому единственным лучшим предиктором обострений на всех стадиях GOLD на данный момент является история обострений [80].

Установленные на настоящее время недостаточная прогностическая точность спирометрической и комбинированной оценки, клиническая гетерогенность больных с ХОБЛ, длительное малосимптомное течение заболевания, значительное количество фенотипов заболевания в значительной степени отражают сложность патогенеза данного заболевания [47].

Данная особенность ХОБЛ требует появления новых стратегий ведения больных, которые будут использоваться не только для выявления особенностей болезни, но и для оценки индивидуального риска для каждого пациента. По мнению А. Alvar et al. лечение пациентов должно быть нацелено на эндотипы, которые отражают подтипы пациентов, характеризующиеся определенным патофизиологическим механизмом. А. Alvar считает, что конкретные биомаркеры этих эндотипов были бы особенно полезны для клинической практики, особенно когда одного клинического фенотипа недостаточно для определения основного эндотипа [86].

В настоящее время предложены уже несколько потенциальных эндотипов и их биомаркеров при ХОБЛ. Наиболее изученным среди них является эндотип ХОБЛ, связанный с недостаточностью, альфа-1 антитрипсина [204]. Особый интерес вызывает эндотип с персистирующим системным воспалением – подгруппой пациентов с постоянно повышенным уровнем биомаркеров воспаления (лейкоцитов, С-РБ, ИЛ-6, фибриногена), которые имеют значительно увеличенные

частоту обострений и смертность от всех причин [30,111]. Выделение эндотипа ХОБЛ с эозинофилией/высоким уровнем Th2-лимфоцитов позволило выделить категорию пациентов, у которых применение ингаляционных кортикостероидов наиболее эффективно [100,200,201]. Эндотип с избыточной бактериальной колонизацией получает максимальную выгоду от длительной терапии азитромицином [50,226]. Среди эндотипов отдельно выделяют ряд коморбидных состояний при ХОБЛ, особенно связанных с саркопенией, что обусловлено их неблагоприятным прогнозом [162]. По результатам исследований роли биомаркеров при различных вариантах течения ХОБЛ в настоящее время сформирована концепция “*treatable clinical traits*» или «клинически излечимых признаков», основанная на «контрольной панели» биомаркеров, позволяющих определить эндотип конкретного больного и подобрать персонафицированную терапию при ХОБЛ [47,48].

Таким образом, в настоящее время продолжается активное изучение различных патофизиологических механизмов ХОБЛ в формировании эндотипов заболевания, что может стать основой для выявления новых потенциальных биомаркеров и терапевтических мишеней, которые могут быть использованы для уточнения прогноза и подбора индивидуализированной терапии. Учитывая результаты исследований, полученных на животных моделях и клеточных культурах, демонстрирующих тесную связь между функционированием митохондрий клеток различных тканей и основными патогенетическими механизмами ХОБЛ, а так же потенциальную пользу от коррекции нарушения функций митохондрий, представляется актуальным исследование клинического значения биомаркеров системной вторичной митохондриальной дисфункции у больных с ХОБЛ [40,55,76,144,152,193].

## 1.2. Современные представления о патогенезе ХОБЛ

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) – заболевание со сложным патогенезом, при котором под действием токсичных частиц и газов в патологические изменения вовлекаются бронхи и легочная паренхима [159,164].

Развитие обструкции дыхательных путей у пациентов с ХОБЛ связано со структурными и клеточными изменениями дыхательных путей различного калибра. Терминальные отделы периферических дыхательных путей заканчиваются альвеолами, которые состоят из альвеолоцитов 1 и 2 типа и щёточных клеток (альвеолоциты 3 типа). Пройодимость бронхиол стабилизируется сурфактантом, продуцируемым альвеолоцитами 2-го типа.

Дыхательные пути малого калибра, прилегающие к альвеолам, выстланы эпителием. Эпителиальные клетки состоят из двух основных типов клеток – ресничных и секреторных клетки. Секреторные клетки, в свою очередь, подразделяются на бокаловидные клетки и клетки Клара [30,118]. Под эпителием расположена базальная мембрана, под которой находится слой гладкомышечных клеток. Секреторные клетки выделяют слизь, которая содержит муцины или крупные гликопротеины [30,118].

При ХОБЛ происходит вовлечение стенки периферических дыхательных путей, преимущественно бронхов мелкого калибра, в воспалительный процесс. Итогом воспаления становится фиброз и гипертрофия гладкомышечного слоя стенки бронха, метаплазия эпителия просвета бронха с увеличением количества бокаловидных клеток и окклюзией просвета слизью, секретироваемой в избытке [118].

Одной из отличительных черт воспалительной реакции при ХОБЛ является деформация стенок и сужение просвета дыхательных путей, а также разрушение альвеол и, как следствие, – развитие эмфиземы [30,118].

Известно, что дефицит  $\alpha$ -1-антитрипсина у человека приводит к развитию буллезной эмфиземы [101]. Мишень для  $\alpha$ -1-антитрипсина - нейтрофильная эластаза. Активное исследование протеаз воспалительных клеток и их ингибиторов стало основой гипотезы дисбаланса в системе протеазы/антипротеазы в патогенезе

эмфиземы при ХОБЛ. В рамках этой концепции нормальное легкое, как полагают, защищено антипротеазным «экраном», который нейтрализует протеолитические ферменты, выделяющиеся в дыхательных путях или паренхиме нейтрофилами и макрофагами [101,104,118]. В настоящее время установлено, что основными источниками протеаз в легких являются гранулоциты и макрофаги, в меньшей степени – эпителиоциты, а к выделяемым ими протеазам относят эластазу лейкоцитов, протеиназу 3, матриксные металлпротеиназы, цистеиновые протеиназы, и активаторы плазминогена [104]. Считается, что развитие и прогрессирование эмфиземы вызвано увеличением активности протеаз и/или уменьшением мощности антипротеазного компонента системы.

Наряду с концепцией дисбаланса протеаз/антипротеаз в настоящее время установлено, что важную роль в патогенезе ХОБЛ играет хронический усиленный воспалительный ответ, связанный с инфильтрацией бронхиального дерева и легочной паренхимы клетками врожденной и адаптивной иммунной системы [51,217]. Предполагается, что причиной этого является особый тип воспалительного ответа при ХОБЛ, который похож на воспалительный ответ на воздействие табачного дыма, но отличается большей выраженностью и тенденцией к персистированию, даже при прекращении воздействия этиологических факторов [51]. Так установлено, что воспалительные изменения после прекращения курения сохраняются в течение нескольких месяцев и иногда носят необратимый характер [190]. Во время прекращения курения количество лейкоцитов в крови снижается, заметно снижается гиперплазия бокаловидных клеток в дыхательных путях, а также уменьшается число макрофагов и нейтрофилов в жидкости, полученной путем бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ). Тем не менее, в дыхательных путях экс-курильщиков сохраняется высокий уровень ИЛ-8 и нейтрофилов по сравнению с некурящими [190]. Результаты работ, посвященных исследованию взаимосвязи длительности отказа от курения и активности адаптивного звена иммунной системы, демонстрируют, что в дыхательных путях пациентов с ХОБЛ воспалительный ответ сохраняется даже после прекращения курения, хотя прогрессирование воспаления может постепенно затухать [63]. К сожалению, даже

при легкой степени тяжести ХОБЛ прекращение курения не всегда эффективно в предотвращении прогрессирования заболевания [62]. Данная особенность воспалительного ответа при ХОБЛ указывает на наличие механизмов самоподдержания, устранение которых может явиться потенциальной целью терапии ХОБЛ.

По данным ряда исследований установлено, что для ХОБЛ типичен воспалительный паттерн, связанный с увеличением количества нейтрофилов в просвете дыхательных путей и увеличением количества макрофагов, Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов, активируемых дендритными клетками [219]. Таким образом, патогенез ХОБЛ имеет иммунологический аспект, представленный серией ответов клеток врожденного и адаптивного звеньев иммунной системы. Табачный дым активирует антиген-репрезентирующие клетки, такие как эпителиальные клетки и макрофаги, путем активации рецепторов распознавания образов (PRR) посредством высвобождения молекулярных паттернов, ассоциированных с повреждением (DAMPs) из умирающих или находящихся в стрессовом состоянии клеток. Сигналы от различных клеток врожденной иммунной системы приводят к активации дендритных клеток и, впоследствии, индуцируют адаптивный иммунный ответ, включающий Т-хелперные (Th1 и Th17) CD4 + Т-клетки, CD8 + Т-цитотоксические и В-клеточные ответы. Кроме того, вирусные и бактериальные инфекции способствуют не только развитию обострений ХОБЛ, но также усилению и сохранению хронического воспаления при стабильной ХОБЛ через нарушение регуляции различных врожденных и адаптивных путей иммунной сигнализации [66,82,123]. Таким образом, ряд исследователей предполагает, что процесс самоподдержания хронического воспаления при ХОБЛ может иметь в основе иммунологический механизм, связанный с Т-лимфоцитами памяти, изменениями микробиома легких или же с развитием аутоиммунного процесса. Эта концепция находит подтверждение в результатах исследований, демонстрирующих обнаружение антител к эластину и эндотелию у больных с ХОБЛ [54,60,123].

Наряду с иммунологическим аспектом усиленного воспаления при ХОБЛ, в качестве еще одного механизма самоподдержания воспалительной реакции, активно исследуется изменение функциональной активности митохондрий – клеточных органелл, для которых открыта роль сигнального звена в процессах регуляции врожденного и адаптивного иммунитета [231,232].

Необходимо отметить, что по результатам последних исследований обнаружено, что митохондрии посредством передачи сигналов и через различные митохондриальные метаболические пути задействованы в механизме контроля адаптивного иммунного ответа, включая дифференцировку CD4 + Т-клеток, образование CD8 + Т-клеток памяти и другие процессы [231]. Было обнаружено, что митохондриальный аэробный гликолиз необходим для эффективной активации Т-клеток посредством генерации митохондриальных АФК, которые необходимы для оптимальной активности ядерного фактора активированных Т-клеток и передачи сигналов, опосредованной проксимальными Т-клеточными рецепторами [231]. Открытие белка митохондриальной противовирусной передачи сигналов (MAVS), который был первым локализованным митохондриями белком, вовлеченным в противовирусный врожденный иммунный ответ, явилось прорывом в установлении роли митохондрий во врожденном иммунитете [121]. Интересно, что недавние исследования показали, что передача сигналов MAVS может играть важную роль в патогенезе ХОБЛ [74]. В настоящее время продолжаются исследования роли митохондрий в иммунологических процессах у больных с ХОБЛ. На основании полученных результатов предполагается, что большинство характерных признаков, вовлеченных в патогенез ХОБЛ, которые принято связывать с действием табачного дыма, и включающие усиленную секрецию слизи и внутриальвеолярное воспаление, повышенные уровни активности протеаз и концентрации цитокинов, нарушение регуляции продукции активных форм кислорода (АФК), а также усиленный апоптоз и гибель альвеолярных клеток, обусловлены дисрегуляцией MAVS-опосредованной передачи сигналов [74,129].

Эти наблюдения также подтверждают мнение о том, что митохондриальная дисфункция, индуцированная табачным дымом, или дисрегуляция

митохондриальных молекул может быть ключевым фактором, способствующим развитию ХОБЛ. По мнению M.J. Kang будущие исследования функционального состояния митохондрий клеток иммунной системы будут полезны не только для более глубокого понимания аспектов патогенеза ХОБЛ, но и для разработки потенциальной терапии, модифицирующей болезнь [129].

Наряду с воспалением одним из главнейших аспектов патогенеза ХОБЛ принято считать окислительный стресс (ОС). Под термином «окислительный стресс», введенным Helmut Sies, первоначально понималось нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в пользу первого, приводящее к потенциальному ущербу [197].

В связи с установлением факта образования АФК, обладающих выраженными прооксидантными свойствами, в клетках при физиологических состояниях и выявления их роли в качестве сигнальных молекул в 2007 году Dean Jones и Helmut Sies обновили определение окислительного стресса и в настоящее время под ним понимают дисбаланс между окислителями и антиоксидантами в пользу окислителей, приводящий не только к молекулярному повреждению, но и к нарушению окислительно-восстановительного контроля передачи межклеточного сигнала [196].

Таким образом, было подчеркнуто, что в ходе окислительного стресса может происходить не только повреждение всех структурных элементов клетки таких как липиды, белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и их составляющие, но и срыв механизмов физиологической регуляции процессов клетки, который осуществляется путем передачи сигналов через изменение уровня генерации АФК и окислительно-восстановительный статус клетки [196].

В физиологических условиях в качестве источников эндогенных АФК рассматривают митохондрии, пероксисомы, эндоплазматический ретикулум и мембраны клетки. Образование АФК может происходить двумя путями. В рамках неферментативного пути происходит ступенчатое восстановление молекулярного кислорода в условиях избытка восстановителей [11]. Данный путь образования АФК имеет место в физиологических условиях – около 2% кислорода

превращается в АФК в ходе работы дыхательной цепи митохондрий, и большая часть их нейтрализуется. Развитие дыхательной недостаточности у больных с ХОБЛ приводит к снижению насыщения крови кислородом ( $SpO_2$ ) и развитию тканевой гипоксии, которая из-за накопления избытка восстановленных коферментов  $NADH \cdot H$  и  $FAD \cdot H_2$  приводит к значительному увеличению образования АФК в митохондриях, что может приводить к повреждению митохондрий и развитию митохондриальной дисфункции [138].

Ферментативный путь получения АФК связан с участием оксидаз и оксигеназ, что особенно характерно для таких клеток как нейтрофилы, эозинофилы и макрофаги, использующих оксидазы ( $NADH$ -оксидаза, пероксидаза) для генерации АФК в качестве бактерицидных агентов [160]. В патогенезе ХОБЛ наряду с эндогенными источниками АФК подчеркивают роль экзогенных. К последним относятся компоненты табачного дыма и продукты сгорания биотоплива. В расчете на одну затяжку сигаретный дым содержит в газовой фазе приблизительно  $10^{15}$ – $10^{17}$  молекул окислителей и свободных радикалов [133]. Среди этих соединений идентифицированы такие как супероксиданион радикал ( $O_2^{\bullet -}$ ), перекиси и эпоксидные соединения, активные формы азота и акролеин. Окислители, входящие в состав сигаретного дыма, повреждают эпителиальные клетки дыхательных путей, инициируя развитие воспалительной реакции в ответ на повреждение. Важно отметить, что компоненты табачного дыма непосредственно способны вызывать нарушение клеточного дыхания, что превращает богатые митохондриями альвеолоциты 2 типа в патологический источник АФК [75].

В физиологических условиях образующиеся АФК нейтрализуются механизмами антиоксидантной защиты. По мнению Е.Е. Дубининой антиоксидантную защиту клетки можно рассматривать в виде антиоксидантной системы (АОС), которая включает специфические и неспецифические компоненты [11].

Специфические компоненты подразделяются на:

- ферментативные: СОД, каталазу, глутатионпероксидазу;

- неферментативные: витамины с ненасыщенными углеродными связями - токоферол, убихинон, аскорбат; трансферрин и церулоплазмин, способные секвестрировать ионы металлов переменной валентности; билирубин, мочевая кислота, глутатион и тиольные группы белков, способные связывать АФК.

К неспецифическим компонентам АОС относят белки, связывающие металлы переменной валентности [11]. В исследованиях, посвященных значению компонентов антиоксидантной защиты организма при ХОБЛ, было выявлено снижение содержания неферментативных антиоксидантов и емкости АОС плазмы и тканей легких при ХОБЛ [96,97]. По мнению М.Е. Nicks et al. это обстоятельство может иметь важное значение для развития обострения у таких больных [163].

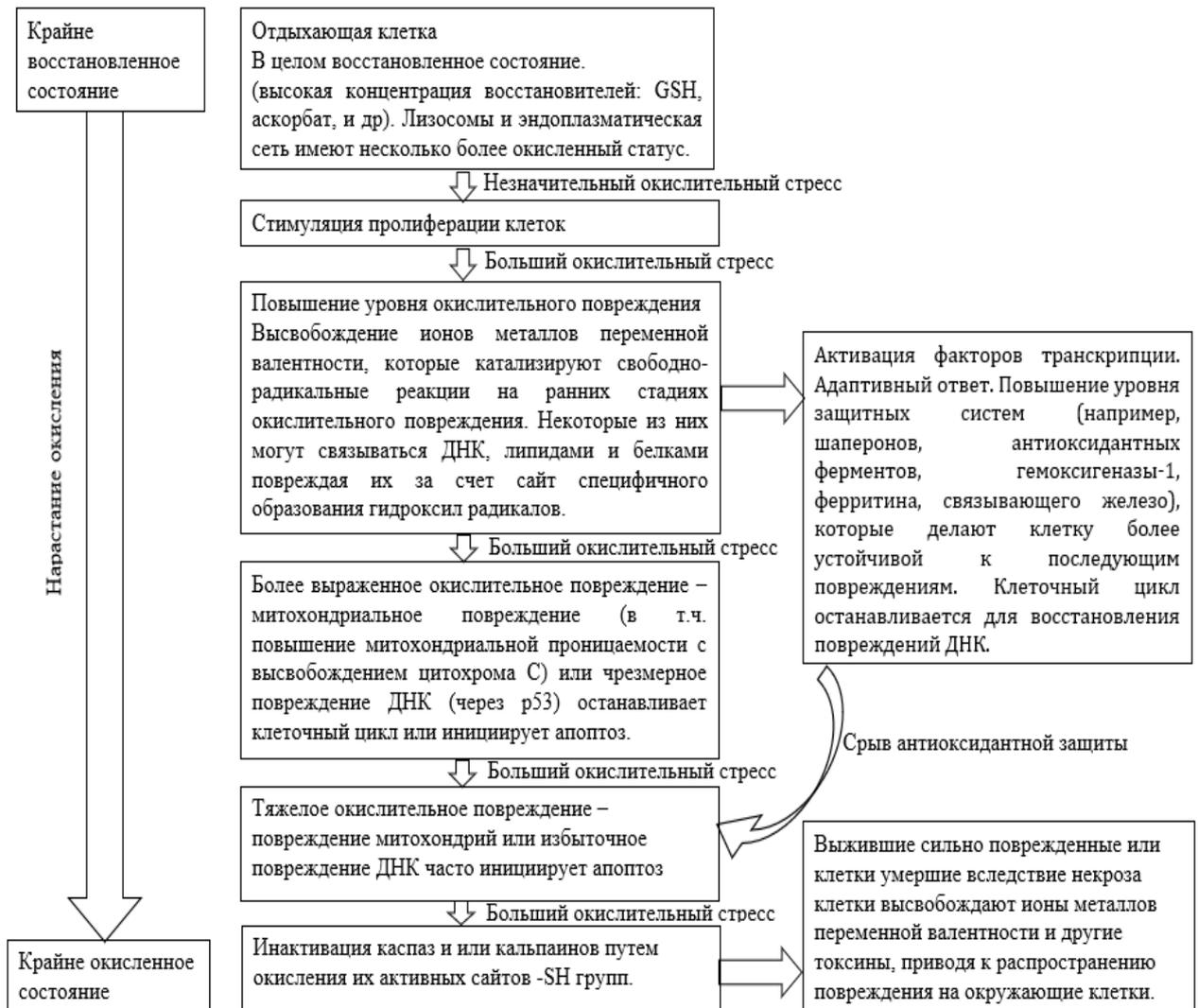


Рисунок 1 - Клеточный ответ на окислительный стресс

(цит. по: Halliwell B. et al., 2015)

В настоящее время установлено, что клеточный ответ зависит от степени изменения продукции АФК. В то время как слабые стимулы принимают участия в стимуляции процессов клеточного деления, значительный прирост продукции супероксиданиона и его дериватов может приводить к инициации процессов апоптоза или даже к некроптозу [11,115]. Гибель и чрезмерный окислительный стресс клетки становится источником DAMPs, активирующим клетки врожденной иммунной системы и запускающим воспалительный процесс [156]. В свою очередь активированные воспалительные клетки становятся источником АФК, усугубляющим окислительный стресс (рисунок 1).

Для предупреждения повреждающего действия в условиях повышения уровня образования АФК в клетках формируется адаптивный ответ, связанный с функционированием системы Nrf2/Keap1. Однако у пациентов с ХОБЛ наблюдается нарушение механизмов его реализации [89,211]. Было выявлено, что окислительный стресс значительно уменьшает активность и экспрессию деацетилазы гистонов 2 (HDAC2) через активацию фосфоинозитид-3-киназы дельта и пероксинитрит-индуцированного нитрозилирования тирозиновых остатков белков [211]. Результаты исследований позволяют предположить, что повышенный уровень гистон-ацетилтрансферазной активности, с одной стороны, приводит к ингибированию Nrf2-пути ответа на окислительное повреждение, а с другой стороны, открывает хроматиновые структуры для транскрипции множества провоспалительных генов [89,211].

При ХОБЛ воздействие избыточного количества АФК приводит к истощению как ферментативных, так и неферментативных элементов АОС, а изменения генетической регуляции антиоксидантной защиты обуславливают срыв механизмов адаптации. Указанные особенности связаны с дальнейшим усилением воспалительного процесса и препятствуют действию кортикостероидов из-за инактивации активированных провоспалительных генов.

Таким образом, у больных ХОБЛ создаются предпосылки для развития и поддержания ОС, связанные как с избыточным образованием АФК митохондриями и воспалительными клетками, так и со снижением уровня АОС, что создает

условия для формирования порочного круга самоподдерживающегося воспаления при ХОБЛ.

Через механизмы изменяющие уровень экспрессии генов ОС уменьшает экспрессию и активность сиртуина-1, ключевой молекулы, связанной с процессами старения. Уменьшение выработки сиртуина-1 легкими и клетками пациентов с ХОБЛ лежит в основе ускоренного старения легких, наблюдаемого у пациентов с ХОБЛ. Хронический окислительный стресс так же предрасполагает к развитию рака легкого через активацию факторов роста и повреждение ДНК [149].

Достижения в изучении процессов клеточного старения и апоптоза позволяют предположить еще два аспекта патогенеза ХОБЛ тесно связанные с ОС и митохондриальной дисфункцией. Один из механизмов – это нарушение соотношения между развитием апоптоза и очищением апоптотических клеток в легких [81,225,236].

Легкое уникально тем, что клетки альвеолярного эпителия постоянно подвергаются внешним физическим и химическим воздействиям. Считается, что в качестве физиологического ответа на эти клеточные повреждения апоптотические клетки удаляются и заменяются, что представляет собой строго регулирующийся физиологический механизм поддержания целостности альвеолярных отделов [225].

В соответствии с «гипотезой апоптоза» в результате продолжающегося повреждения клеток чрезмерная индукция апоптоза или блокада восполнения поврежденных клеток может нарушить гомеостаз обновления альвеолярной перегородки, итогом чего станет развитие эмфиземы [225,236]. Обнаружение в исследовании повышенного уровня апоптоза клеток альвеолярной перегородки легких пациентов с ХОБЛ указывает на правомочность подобного механизма [81]. Необходимо подчеркнуть, что в данном исследовании связь между воздействием табачного дыма и повышенным уровнем апоптоза в легких больного ХОБЛ была реализована через активацию митохондриального внутреннего пути апоптоза, что было доказано иммуногистохимически [81].

К другому предполагаемому аспекту патогенеза ХОБЛ относится гипотеза ускоренного старения легких. Считается, что старение является дегенеративным процессом, вызванным кумулирующим повреждением, которое приводит к клеточной дисфункции, тканевой недостаточности и смерти [65,216]. Подобно другим системам органов, биологическое старение легочной системы связано со структурными изменениями, приводящими к прогрессирующему снижению функций органа, и термин «старение легких» обычно применяется для обозначения органа [213]. Важно отметить, что такие признаки старения как укорочение теломер, нестабильность генома, эпигенетические изменения, митохондриальная дисфункция, нарушение регуляции метаболизма и истощение стволовых клеток, были обнаружены в тканях легких у больных с ХОБЛ [143].

Подводя итог вышесказанному, необходимо отметить, что митохондрии играют одну из центральных ролей в патогенезе ХОБЛ и представляют собой физическую точку конвергенции для многих сигналов, индуцирующих гибель клеток при срыве адаптационных возможностей [107].

### **1.3. Функционирование митохондрий в норме и при патологии**

Митохондрии представляют собой полуавтономные клеточные органеллы, предположительно образовавшиеся из протобактерий эндосимбиотическим путем. Они не только являются местом для процессов окислительного фосфорилирования и метаболизма жирных кислот, но также принимают участие в регуляции клеточного ответа на опасность и повреждение [161].

Позиционируясь как ключевой узел для метаболических потоков, митохондрии уникальным образом адаптированы для коммуникации с ядром клетки для передачи информации как клеточных, так и внеклеточных ответов на воспринимаемые угрозы [232]. Эти угрозы могут характеризоваться изменением доступности нутриентов или кислорода, улавливаясь через изменения в переносе электронов, присутствием вирусной РНК, воспринимаемой через митохондриальный противовирусный сигнальный белок. Митохондрия отвечает через изменения выработки активных форм кислорода (мТАФК), изменения в

полярности митохондриальной мембраны, сигнализирование через митохондрий ассоциированные мембраны и белки [78,232]. От функционирования митохондрий критически зависят сигнальные каскады, связанные с NF- $\kappa$ B или интерферонами, инициация путей ответа на клеточный стресс. Повреждение митохондрий с высвобождением митохондриальных белков или ДНК является как мощным активатором передачи сигнала элементам врожденной иммунной системы, так и инициальным звеном апоптоза, приводящим к гибели клетки [69,78,232].

Клеточное дыхание тесно переплетено с функционированием дыхательной системы митохондрий. Аэробные метаболические клеточные процессы участвуют в передаче энергии углеводородных связей из пищи в высокоэнергетические связи аденозинтрифосфата (АТФ), поглощая кислород и генерируя диоксид углерода (окислительное фосфорилирование, ОФ) [155]. Вентиляция, обмен газов и циркуляция крови тесно сопряжены в процессе клеточного окислительного фосфорилирования, доставляя кислород и удаляя диоксид углерода. Совместно они определяют общую респираторную способность организма, измеряемую как максимальное потребление кислорода в течение физической нагрузки. Эти хорошо изученные закономерности объясняют уменьшение толерантности к физической нагрузке при обструктивных заболеваниях дыхательных путей (за счет нарушения вентиляции), фиброзе легкого (из-за нарушения газообмена), сердечной недостаточности (из-за нарушения кровообращения) или детренированности/декондиционировании (из-за снижения способности клеток к потреблению кислорода) [105,120,147].

Продукция АФК является неизбежным следствием окислительного фосфорилирования. Высокоэнергетические электроны проходят через митохондриальную ЦПЭ в конце, восстанавливая кислород до воды в реакции катализируемой митохондриальной цитохром С оксидазой [155]. Энергия переноса от электронов используется для перекачки протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану в межмембранное пространство для создания измеряемого электрохимического протонного градиента, который используется АТФ-синтазой для создания АТФ. Некоторые электроны непосредственно

«утекают» на кислород на промежуточных этапах клеточного дыхания, приводя в результате к формированию супероксид-анион радикала, который в дальнейшем распадается на перекись водорода посредством супероксиддисмутазы (СОД), которая присутствует в высоких концентрациях в митохондриях [43,227] (рисунок 2).

Хотя большинство митохондриальных АФК нейтрализуются внутри митохондрий, некоторые утекают в цитозоль [237]. Высвобождение мтАФК определяется, в первую очередь, такими факторами, как окислительно-восстановительный статус, сопряжение компонентов комплексов ЦПЭ, потоком электронов, доступностью кислорода. К менее главным факторам относят доступность антиоксидантов, влияние лекарственных препаратов и химических агентов [229].

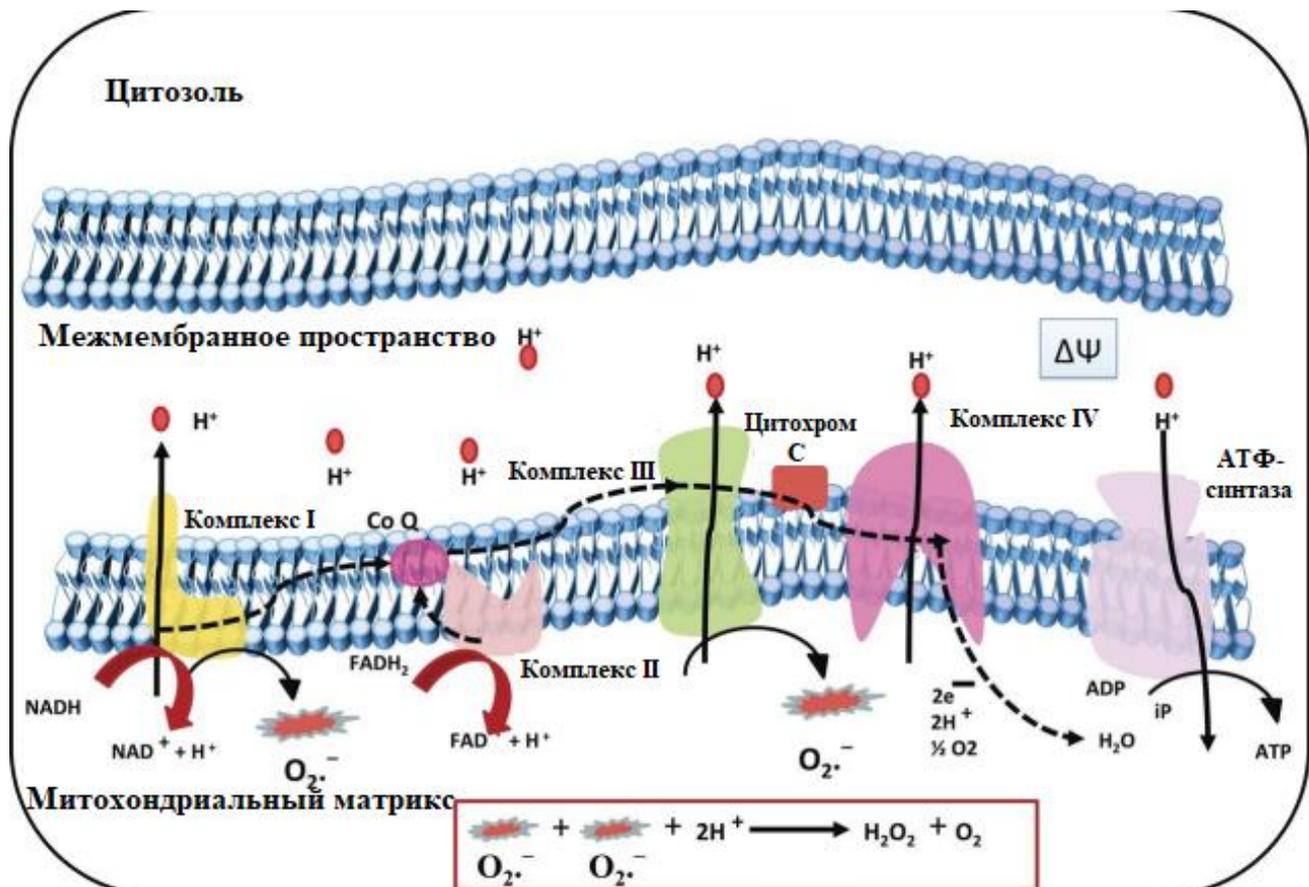


Рисунок 2 – Образование активных форм кислорода на ЦПЭ  
(цит. по: Agrawal A., Mabalirajan U., 2016)

Хотя большинство митохондриальных АФК нейтрализуются внутри митохондрий, некоторые утекают в цитозоль [237]. Высвобождение мтАФК определяется, в первую очередь, такими факторами, как окислительно-восстановительный статус, сопряжение компонентов комплексов ЦПЭ, потоком электронов, доступностью кислорода. К менее главным факторам относят доступность антиоксидантов, влияние лекарственных препаратов и химических агентов [229].

Срыв АОС и повреждение митохондрий ведет к нарушению митохондриальной функции и падению электрохимического градиента [105,172]. Важно отметить, что митохондриальная ДНК более подвержена окислительному повреждению и нарушениям репаративного аппарата при развитии ОС, чем ДНК ядра клетки [52]. В связи с этим качественный уровень функционирования митохондрий поддерживается в ходе процессов митохондриальной динамики. Под митохондриальной динамикой подразумевается расщепление или слияние митохондрий, что позволяет поддерживать высокую способность к функционированию при неблагоприятных условиях. Процессы расщепления ведут к фрагментации митохондрий, что сопровождается значительным расхождением митохондриальной ДНК, в то время как процессы митохондриального слияния способствует смешению митохондриальных ДНК и способствует сохранению функции через различные механизмы.

Сочетание процессов слияния и расщепления поддерживает уровень мтДНК, сохраняет правильность мтДНК, и позволяет клеткам адаптироваться к высокому уровню мутаций генетического материала митохондрий [153]. При крайней выраженности митохондриальных нарушений полностью деполяризованная нефункционирующая митохондрия инициирует каскад процессов, ведущих к ограничению митохондриальной подвижности и захвату фагофорой (митофагии). Хотя сложная система гомеостаза поддерживает оптимальное функционирование митохондрий в здоровых клетках, их нарушение делает клетки подверженными для мтАФК – опосредованного повреждения [176].

Митохондриальная энергия необходима для функционирования более чем 40 типов клеток, составляющих легкие [30,95]. Некоторые из них, например, альвеолярные эпителиоциты 2 типа, секретирующие сурфактант, или цилиарный эпителий и клетки Клара, что находятся в дыхательных путях, метаболически высоко активны и богаты митохондриями. Нарушение клеточной биоэнергетики ведет к недолговечности эпителия, снижению барьерной функции, нарушению секреции и увеличению склонности к воспалению [210].

Бронхопульмональная дисплазия, астма, ХОБЛ и легочная гипертензия в значительной степени ассоциированы с митохондриальной дисфункцией во множестве исследований [150,207]. Митохондриальный дефект обычно характеризуется повышением продукции мтАФК, аномальной морфологией и нарушением процессов гомеостаза. Дефектные митохондрии с нарушением окисления жирных кислот были ассоциированы с уменьшением подвижности легких у мышей, что возможно опосредованно эффектами длинноцепочечных ацил-карнитиновых эфиров на легочный сурфактант. Установлено, что некоторые генетические дефекты были связаны с нарушением процессов митохондриального дыхания при легочной гипертензии.

Таким образом, нить митохондриальной дисфункции проходит через широкий круг легочной патологии. Бронхиальная астма и ХОБЛ являются распространенными легочными заболеваниями, в которых связь с митохондриями исследована в наибольшей степени.

Восприимчивость митохондриальной ДНК к окислительному повреждению со стороны факторов внешней среды, например, таких как сигаретный дым, считается одним из важных аспектов заболевания ХОБЛ. Было продемонстрировано, что первично бронхиальные эпителиальные клетки бывших курильщиков с ХОБЛ имеют в значительной степени нарушенную митохондриальную морфологию похожую на ту, что обнаруживалась у культивируемых бронхиальных эпителиальных клеток, подвергавшихся воздействию экстракту табачного дыма. Это демонстрирует, что, по вероятно, повреждения митохондрий от сигаретного

дыма стойкий характер [182]. Дым от дерева, важная причина ХОБЛ у некурящих, продемонстрировал похожий токсический эффект на митохондрии [190,233].

Эффекты табачного дыма не ограничиваются эпителиальными клетками: гладкие мышечные клетки от пациентов с ХОБЛ так же демонстрируют нарушение процессов митохондриального дыхания [171]. Гладкомышечные клетки стенки бронхов больных ХОБЛ отличаются большим уровнем образования мТАФК по сравнению со здоровыми курильщиками, секретирова увеличенные количества провоспалительных цитокинов и более выраженную пролиферацию в ответ на действие трансформирующего фактора роста-бета (ТФР-β). Эти изменения не уменьшаются через несколько пассажей в культуре, но их выраженность может быть уменьшена при применении митохондриально-ориентированных (MitoQ) или митохондриально-локализующихся антиоксидантов (Tiron). В тоже время имеются противоречивые результаты исследований, посвященных стимуляции митофагии с целью коррекции митохондриальной дисфункции, индуцированной табачным дымом. В результатах работы A.M. Choi et al. утверждается, что активация митофагии в эпителиальных клетках легких, которые были подвержены воздействию табачного дыма, ведет к некроптозу и, в конечном счете, к эмфиземе [78]. По данным I. Rahman et al. именно нарушение митофагии ведет к индуцированному табачным дымом клеточному старению, в то время как восстановление митофагии уменьшает выраженность проапоптотических процессов [185]. Важно, что применение митохондриально-таргетированных скавенджеров АФК таких как MitoQ или Mito-Tempo нивелирует негативный эффект табачного дыма в обоих исследованиях.

Роль митохондрий в патогенезе ХОБЛ может расширяться за пределы легких, так как ХОБЛ может проявляться в качестве системного заболевания. В обострение ХОБЛ обычно наблюдают дисфункции мышц конечностей и дыхательной исчерченной мускулатуры, что считается важной частью уменьшения респираторных возможностей и толерантности к физической нагрузке при ХОБЛ [108]. Исследование генетического профиля в мышце Vastus lateralis у госпитализированных пациентов с ХОБЛ продемонстрировало, что некоторые

гены, вовлеченные в процессы митохондриальной дыхательной цепи, были инактивированы, в то время как обнаружилось активация проапоптатических генов [109]. Скелетная мускулатура у больных с ХОБЛ имела сниженное содержание митохондрий, уменьшенную способность генерировать новые митохондрии, уменьшенную активность и сопряжение ЦПЭ, и увеличенную продукцию АФК. Слабость дыхательных мышц, в частности диафрагмы, что могла обуславливать проявления дыхательной недостаточности, так же была ассоциирована с митохондриальной дисфункцией и характеризовалась гипоксией, гиперкапнией, приростом маркеров воспаления и ацидозом [142].

Вместе эти данные в значительной мере поддерживают центральную роль митохондрии в патогенезе ХОБЛ, что характеризуется как хроническое увеличение продукции мтАФК, поддерживаемое после инициации триггерами окружающей среды.

A. Agrawal et al. считают целесообразным изучение механизмов для выделения фенотипов митохондриальной дисфункции. Недостаточность в антиоксидантной защите предрасполагает к раннему развитию заболеванию и плохой обратимости [46]. Данные проявления заболевания могут быть обусловлены с изменением количества и уровня функциональной активности митохондрий, а также из-за генетических полиморфизмов или низкого количества копий мтДНК [46].

A. Agrawal указывает на значение выявления механизмов самоподдержания воспалительного процесса в контексте вновь появившихся взглядов что астма и ХОБЛ отражают различные фенотипы продолжающегося процесса с перекрестом общих особенностей, при этом тяжелая астма очень похожа на ХОБЛ [46,177].

Таким образом, состояние митохондрий напрямую определяют здоровье легких, а оценка функционального статуса митохондрии может стать полезным биомаркером для диагностики или лечения легочных заболеваний [207].

## **1.4. Характеристика показателей митохондриальной дисфункции, изучаемых в диссертационном исследовании**

### **1.4.1. Окислительно-модифицированные белки**

Аэробный обмен веществ неразрывно связан с образованием АФК и активных форм азота (АФА), различающихся по периоду полураспада, а также по своей реакционной способности по отношению к функциональным группам биомолекул. Контролируемый синтез и деактивация АФК / АФА внутри клеток и обратимость некоторых окислительных модификаций в настоящее время широко признаются в качестве важных регуляторных механизмов клеточного метаболизма [64,119,191]. Недостаточная активность АОС, усилением генерации АФК / АФА в клетке и повышенное поступление прооксидантов из окружающей среды способны вызвать окислительный стресс, что сопровождается случайным окислительным повреждением широкого спектра биомолекул с потерей их функции и часто связано с гибелью клеток [169,214]. Среди всех биомолекул белки являются основными мишенями для АФК / АФА, и окисление боковых цепей аминокислот принято разделять на обратимые и необратимые окислительные посттрансляционные модификации. В то время как обратимые окислительные модификации белков, такие как образование сульфеновых кислот, S-нитрозилирование, дисульфидные мостики и S-глутатионилирование остатков цистеина, являются частью нормального функционирования клеток, а обратимые окисление/нитрозилирование участвуют в окислительно-восстановительных каскадах и представляют собой механизм для защиты от дальнейшего необратимого повреждения белков [113,195], необратимые окислительные модификации остатков триптофана, тирозина, лизина, гистидина и цистеина в результате атак АФК часто приводят к потере функции белка, нарушению фолдинга, накоплению или деградации, что в итоге сопровождается повреждением клеток [167,178,192]. Следовательно, и АФК, и АФА играют ключевую роль в физиологических и патофизиологических процессах (рисунок 3).

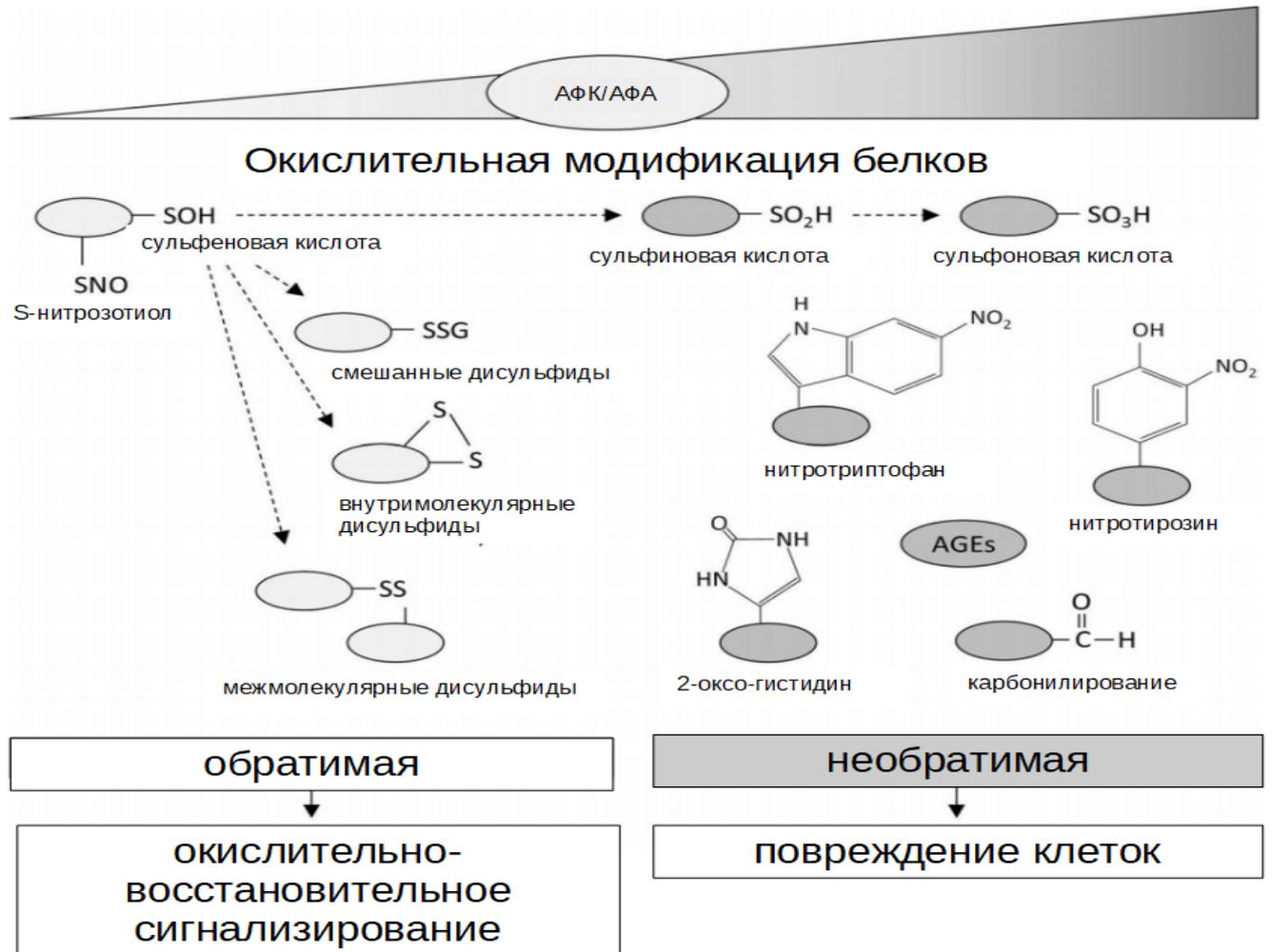


Рисунок 3 – Типы окислительной модификации белков

(цит. по: Lennicke C. et al., 2016)

Образование карбонилированных белков определяется как необратимая посттрансляционная модификация, вызванная окислением. В этом процессе карбонильные (оксо) группы, такие как альдегид- и кето-, либо генерируются в аминокислотных боковых цепях белков, либо альтернативно генерируются посредством окислительного расщепления основной цепи белка. До настоящего времени было выявлено несколько механизмов, приводящих к карбонилированию белков [203]. Прежде всего, окисление белка может быть вызвано реакцией гидроксильных радикалов, атакующих боковые цепи определенных аминокислот - обычно пролина, аргинина, лизина или треонина [202].

Наиболее распространенными карбонильными продуктами, образующимися в результате этих реакций, являются глутаминовый полуальдегид и аминокетонный

полуальдегид, которые получают из аргинина и лизина соответственно [112]. Альтернативно, перекисное окисление липидов с помощью АФК приводит к образованию активных форм карбонила (RCS), таких как 4-гидроксиноненал (4-HNE), 2-пропеналь (акролеин). Эти RCS могут реагировать с аминокислотными боковыми цепями цистеина, гистидина и лизина, образуя тем самым преимущественно основания Шиффа или аддукты Михаэля [117].

Наконец, реакционноспособные карбонильные группы могут быть введены путем гликирования, возникающего в результате реакции аминогруппы остатков лизина с конечными продуктами гликирования [114]. Все эти модификации в основном связаны с драматическими последствиями для активности или функций этих белков.

Карбонильные аддукты белков являются относительно стабильными (их клиренс характеризуется часами и днями) в отличие от продуктов перекисного окисления липидов, которые удаляются из клеток в течение минут [114,184]. Кроме того, окисленно модифицированные белки образуются рано в условиях окислительного стресса и не являются результатом одного конкретного окислителя, поэтому их можно назвать маркером общего окисления белка. Поэтому определение карбонилированных белков является наиболее часто используемым маркером для оценки окислительного повреждения белка. Карбонилированные белки могут быть обнаружены различными методами. Например, восстановление с помощью борогидрида, меченного радиоактивным изотопом, вводит в белок радиоактивную метку. Чаще же всего используются некоторые производные гидразина, чаще всего 2,4-динитрофенилгидразин (2,4-ДНФГ) или биотин гидразин, которые позволяют обнаружить карбонильные функциональные группы в окисленном белке. В течение последних трех десятилетий большинство этих методов ссылались на основные методы, описанные R.L. Levine et al. [91,67] с использованием высокочувствительной ДНФГ-модификации окисленных белков с последующим обнаружением либо спектрофотометрическими методами, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, либо с использованием анти-ДНФГ антител в иммуноблоттинге

[93] или ELISA [183]. В дополнение к этому протеомные методы позволяют детально охарактеризовать механизмы повреждения белка, например, в крови [174].

Тот факт, что для анализа ДНФГ-derivатизированных белков не требуется специального оборудования, привел к применению этих методов в многочисленных исследованиях.

Таким образом, карбонилирование белков является наиболее широко используемым биомаркером повреждения клеток, вызванного окислительным стрессом, и связано с различными заболеваниями, такими как опухоли, нейродегенеративные заболевания, атеросклероз и диабет [103,175,218]. У пациентов с ХОБЛ карбонильные производные белков были обнаружены как в легких, так и в крови, а их уровни коррелировали с тяжестью заболевания, измеряемой снижением ОФВ<sub>1</sub> [38,168].

Крайне интересным представляется открытие антигенности карбонилированных белков. В.Т. Kurien и R.H. Scofield указывают, что окислительная модификация белков при хронических заболеваниях, связанных с интенсивным окислительным стрессом, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, склеродермия и болезнь Бехчета, вызывает аутоиммунные реакции на карбонил-модифицированные аутоантигены [131].

В этой связи исследование Paul A. Kirkham et al. демонстрируют, что карбонильный стресс, возникающий в результате хронического воздействия окислителей, способен приводить к образованию потенциально повреждающих нео- или аутоантител к карбонилированным собственным белкам как у больных с ХОБЛ, так и на мышинной модели хронического воздействия окислительного стресса. При этом иммуногистохимически доказано наличие активации комплемента вокруг эндотелия сосудов легких, что характеризовало реакции антител на карбонил-модифицированные белки как нацеленные на эндотелиальные клетки в паренхиме легких у пациентов с ХОБЛ [170].

Таким образом, окисленно модифицированные белки с одной стороны являются интегральным маркером оксидативного повреждения клеток и тканей, с

другой могут проявлять антигенность и возможно стимулировать развитие аутоантител у пациентов с ХОБЛ, что, по всей видимости, вносит вклад в поддержание хронического воспаления.

#### 1.4.2. Сукцинатдегидрогеназа

Сукцинатдегидрогеназа (СДГ) или сукцинат:убихиноноксидоредуктаза (ЕС 1.3.5.1) катализирует превращение сукцината в фумарат с переносом двух электронов на мембранно-связанный убихинон в аэробных условиях.

СДГ, являясь комплексом II дыхательной цепи, обеспечивает прямую связь между циклом трикарбоновых кислот и работой дыхательной цепи митохондрий [139,126]. Этот комплекс расположен на внутренней мембране митохондрий и состоит из 4 субъединиц: флавопротеина (субъединица А), связывающего сукцинат и ФАД, железосерного белка (субъединица В), содержащего 3 железосерных центра ( $Fe_2S_2$ ,  $Fe_4S_4$ ,  $Fe_3S_4$ ), гидрофобных субъединиц С и D, связанных с внутренней мембраной и содержащих по 1 молекуле гема b. Субъединицы А и В гидрофильны, локализованы в митохондриальном матриксе. Сайт связывания убихинона сформирован за счет протомеров В, С и D [96].

В ходе реакции окисления перенос электронов происходит от субстрата на молекулу кофермента ФАД, а затем, через железосерные центры субъединицы В на убихинон. Считается, что гем b в ходе реакции стабилизирует промежуточный продукт реакции – семихинон - и предотвращает утечку электронов и образование АФК [96]. Наличие железосерных центров и гема создает возможность взаимодействия с NO (II). Показано, что NO (II) способен ингибировать СДГ. На примере нейронов продемонстрировано, что ингибирование митохондриальной NO-синтазы предотвращало падение активности СДГ и, тем самым, препятствовало снижению уровня АТФ, что, однако могло вызывать негативные для клеток последствия, обусловленные избыточным стимулированием глутаматных рецепторов [96].

Наиболее интересной представляется роль СДГ в адаптации митохондрий различным гипоксическим воздействиям, так как в настоящее время доказано, что

нарушения процессов клеточного дыхания и синтеза АТФ преимущественно связаны с субстратным участком дыхательной цепи.

В условиях нормоксии восстановленный НАД, субстрат дыхательного комплекса I, является основным (55-65%) источником электронов для работы дыхательной цепи, в то время как восстановленный ФАД, являющийся продуктом реакции окисления сукцината составляет значительно меньшую часть (25-30%). Установлено, что в условиях гипоксии происходит подавление электрон-транспортной функции комплекса I, что, в свою очередь, обуславливает прирост образования АФК. В качестве компенсаторной реакции при гипоксии увеличивается вклад комплекса II в процесс клеточного дыхания, который может достигать 70-80%. Данные изменения сопровождаются накоплением сукцината как в крови, так и тканях [57,77,209].

В соответствии с концепцией Л.Д. Лукьяновой о репрограммировании дыхательной цепи в условиях гипоксии можно выделить три стадии изменений.

С первой стадией связаны механизмы мобилизации ресурсов клетки, которые направлены на усиление синтеза АТФ и связаны с повышением электронтранспортной функции комплекса I ЦПЭ.

На второй стадии происходит подавление активности комплекса I ДЦ и компенсаторная активация сукцинатдегидрогеназы, позволяющая сохранить адекватное образование АТФ.

Третья стадия отражает срыв адаптации и декомпенсацию процесса. Она характеризуется снижением мембранного потенциала митохондрий, снижением уровня АТФ, нарушением дыхания, связанного с окислением NAD-зависимых субстратов. Её развитие типично для условий остро возникшей гипоксии или длительного гипоксического воздействия. Итогом третьей стадии становится нарушение функционально-метаболических параметров, контролирующей жизнедеятельность клетки и, как следствие, её апоптоз [135].

В этой связи под проявлениями митохондриальной дисфункции понимается именно снижение активности NADH-убихиноноксидоредуктазы и накопление субстратов цикла Кребса, окисляемых с образованием NADH, в условиях

активности остальных ферментов дыхательной цепи. При многократном повторяющемся или длительном воздействии гипоксии в связи с появлением новых изоформ комплекса I происходит восстановление первоочередной роли NAD-зависимого пути окисления, что приводит к эффективному окислению субстратов в условиях высокого значения соотношения  $NADH/NAD^+$ , характерного для гипоксии, что приводит к постепенному снижению значимости сукцинатоксидазного пути окисления. В рамках долгосрочной адаптации к гипоксии СДГ играет роль лишь временного механизма, необходимого для реализации процессов транскрипционного ремоделирования свойств комплекса I ДЦ [135].

Таким образом, изменение путей окисления субстратов дыхательной цепи от NAD-зависимого на сукцинатоксидазный, выявленное в тканях почек и нервной системы, представляет механизм быстрой адаптации к гипоксии. Исследование этого механизма у больных с ХОБЛ в условиях обострения позволит изучить значение быстрой адаптации митохондрий к гипоксии для формирования клинических проявлений заболевания.

### 1.4.3. Сукцинат

Сукцинат или янтарная кислота наиболее известна как субстрат комплекса II дыхательной цепи. К настоящему моменту изучено множество физиологических эффектов введения экзогенного сукцината: стимуляция гликолиза и глюконеогенеза, нормализация буферных свойств крови, повышение сродства кислорода к Hb в условиях гипоксемии, улучшение работы сердечно-сосудистой системы, увеличение реабсорбционной функции почек [134,135].

При этом относительно недавно было установлено, что физиологические эффекты сукцината реализуются через паракринный тип сигнализации посредством P2Y пуринорецептора GPR91 или Succinate receptor 1, который кодируется геном SUCNR1. Активация рецептора связана с активацией по крайней мере двух сигнальных путей – PI3K и ERK. Предполагается, что рецепторно-сигнальная функция сукцината тканеспецифична [134]. В почках GPR91-

сигнальный каскад вовлечен в механизм гиперфилтрации продуктов метаболизма, при ишемии печени сукцинат через SUCNR1 способствует активации звездчатых клеток в ответ на повреждение органа, при ретинальной ишемии и диабете усиливает нейроваскуляризацию, подавляет липолиз в условиях гипогликемии и избыточного накопления жирных кислот, усиливает как антигенспецифическую активацию лимфоцитов Т-хелперов у человека и мышей, так и опосредует активацию тканевых макрофагов, выступая в качестве провоспалительного сигнала [134].

Большой интерес может представлять опосредуемая через сукцинат метаболическая связь окислительных процессов в митохондриях с адренергической и холинергической системами. Установлено, что в ткани печени стимуляция адреналином включает избирательную активацию сукцинатдегидрогеназы, а сукцинат, в свою очередь, вызывает выделение адреналина и норадреналина [130].

Важно отметить, что сукцинат участвует в посттрансляционной модификации белков через сукцинирование белков, что сопровождается активацией обмена глюкозы и жиров, повышением активности ферментов ЦТК и лактатдегидрогеназы [122,198]. Предположительно, сукцинил-КоА может взаимодействовать с остатками лизина [122,198]. Наряду с участием в посттрансляционной модификации белков для сукцината также установлено регулирующее влияние на экспрессию генов, которое реализуется при повышении его концентрации внутри клетки через ингибирование диоксигеназ, катализирующих окисление метилцитозина – иницирующего шага деметилирования ДНК [61,205].

В исследовании, посвященном изучению метаболома плазмы при ХОБЛ продемонстрированы повышение концентрации сукцината у больных с фенотипом эмфизема с утолщением стенки бронха по сравнению с больными с фенотипом эмфизема без утолщения стенки бронха. Cheng Wang et al. указывают, что на фоне лечения эти различия становятся недостоверными. Авторы указывают, что изменения на фоне лечения связаны с уменьшением воспаления и улучшением функции легких [145]. Л.Д. Лукьянова указывает, что аккумуляция сукцината в

клетках может служить механизмом адаптации на ранних стадиях гипоксии [134,135].

Изменение содержания сукцината внутри клеток и в крови является важным сигнальным механизмом и может рассматриваться в качестве биомаркера адаптивных реакций организма в ответ на гипоксию и воспаление.

#### 1.4.4. Супероксиддисмутаза

Супероксиддисмутазы относятся к классу ферментов антиоксидантов, которые катализируют реакцию дисмутации супероксиданион радикала в молекулярный кислород и перекись водорода [11].

Появление супероксид анион радикала в процессе нормальной жизнедеятельности клетки обусловлено ступенчатостью процесса восстановления кислорода [11,138]. Считается, что, будучи свободным радикалом, супероксид анион может выполнять как сигнальную функцию, так и проявлять повреждающие свойства [11,138,191].

Для элиминации избыточного количества супероксиданион радикала, основным источником которого являются процессы окисления NADH и FADH в митохондриях, в клетках и межклеточном пространстве у человека функционируют три изоформы СОД: Cu/Zn СОД, Mn СОД и экстрацеллюлярная СОД (EcSOD, СОД 3) [11,138].

Цинк/медная СОД или СОД 1 содержит в качестве кофакторов ионы меди и цинка. СОД 1 наиболее широко распространена в тканях и в особенности её много в клетках реснитчатого эпителия. Марганцевая СОД или СОД2 преимущественно локализована в клетках стенки дыхательных путей и в митохондриях. Экстрацеллюлярная СОД является главной СОД в межклеточной жидкости, главным образом, она расположена в легких.

Уровень внеклеточной СОД возрастает в мокроте у курильщиков, в то время как активность внеклеточной СОД уменьшается у больных с ХОБЛ. Снижение активности СОД 3 в значительной степени связывают как с прогрессированием снижения легочной функции у больных с ХОБЛ, так и с подверженностью

эмфиземе [206]. Потенциал СОД как биомаркера антиоксидантной защиты продемонстрировано в исследовании S. Singh et al. на 250 исследуемых, где у больных с ХОБЛ по сравнению со здоровым контролем, включавшим как курящих, так и некурящих лиц, отмечается достоверное снижение активности СОД эритроцитов, которое коррелировало со степенью нарушения функции легких [102].

#### **1.4.5. Мембранный потенциал как маркер митохондриальной дисфункции**

В настоящее время для изучения митохондрий могут использоваться различные подходы. Примером *in vivo* методов могут служить неинвазивные визуализирующие методы [58,59,79] с или без использования радиоактивных меток [151], транскутанные методы мониторинга газообмена [41,87].

Инвазивные методы могут быть использованы для изучения ответа митохондрий непосредственно в момент применения терапевтического воздействия. Для этого исследуются такие показатели как флуоресценция NADH и флавопротеинов [179], концентрация и парциальное давление кислорода в ткани [186]. Однако, все эти методы требуют высокоспециализированных условий исследований, хранения реактивов и дорогостоящего оборудования, не нашедшего широкого применения в клинической практике.

Среди методов определения *in vitro* одним из самых информативных способов оценки клеточного дыхания, обеспечиваемого митохондриями, является оценка потребляемого кислорода. С этой целью применяется полярография с использованием электрода Кларка в различных состояниях митохондрий по В. Chance, респирометрия с высоким разрешением, оптические методы измерения кислорода с помощью специальных зондов. Отличаясь высокой чувствительностью, эта группа методов имеет сильно ограниченный потенциал применения в рутинной клинической практике, в связи со сложностью выделения митохондрий и необходимостью поддержания их жизнедеятельности во время исследования [31].

Наиболее распространены и широко используются методы, связанные с измерением активности митохондриальных ферментов (ЛДГ, ферменты АОС, карнитин трансферазы, mtNOS, ферменты дыхательной цепи и цикла Кребса, и т.д.), их коферментов ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , FAD,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) и концентрации их субстратов (лактат, пируват, карнитин, АТФ и АДФ, NO, и т.л.), а также определения продуктов свободнорадикального окисления [5,12,29].

Однако сложная регуляция процессов клеточного дыхания и образования АТФ требует измерения экспрессии, концентрации и активности целых комплексов показателей для определения характера изменений, связанных с процессами биоэнергетической функции митохондрий, что в совокупности предопределяет трудоемкость и определенную дороговизну исследования [31].

Необходимо подчеркнуть, что функционирование дыхательной цепи напрямую связано с величиной мембранного митохондриального потенциала (ММП,  $\Delta\psi$ ), который признан индикатором функционального статуса митохондрий. Так установлено, что сигаретный дым, способствующий развитию митохондриальной дисфункции, значительно снижает как величину ММП, так и потребление кислорода митохондрий эпителия легких у мышей [154].

Безусловно, измерение только одного  $\Delta\psi$  не позволяет исчерпывающе охарактеризовать особенности, связанные с митохондриальными нарушениями, поэтому предпочтительно изучение показателя  $\Delta\psi$  в комплексе с другими маркерами функций митохондрий. В тоже время этот биомаркер может точно указать на наличие дезадаптивных сдвигов в процессе клеточного дыхания.

Для оценки величины  $\Delta\psi$  используют катионные красители, которые распределяясь в митохондриях и клетках в соответствии с уравнением Нернста, позволяют выявить снижение разности потенциала внутренней мембраны митохондрий – деполяризацию [53]. Один из наиболее используемых флуоресцентных красителей для регистрации митохондриального потенциала - JC 1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензи-мидазолкарбоцианин хлорид).

Исследования последних лет указывают, что мембранный потенциал митохондрий, определяемый с помощью катионных красителей, может стать

новым биомаркером митохондриальной дисфункции наряду с уровнем митохондриальной ДНК и потреблением кислорода [49,149].

Выявление специфических реакций митохондрий клеток тканей легкого, мышц или крови в виде изменения показателей метаболизма митохондрий, клеточного дыхания и окислительного стресса, специфических сигнальных белков или маркеров апоптоза способно объективизировать адаптационный резерв или дезадаптивные изменения в клетках при различных проявлениях заболевания. При этом, в настоящее время рядом исследователей митохондриальная дисфункция мононуклеаров периферической крови рассматривается как возможный предиктор адаптивных реакций всего организма [42,85,140,158].

### **1.5. Перспективы митохондриально-ориентированной терапии ХОБЛ**

В настоящее время ключевым направлением терапии ХОБЛ наряду с уменьшением симптомов и улучшением функции легких относят минимизацию риска будущих обострений, как событий в наибольшей степени, определяющих дальнейший прогноз заболевания [30,111,224].

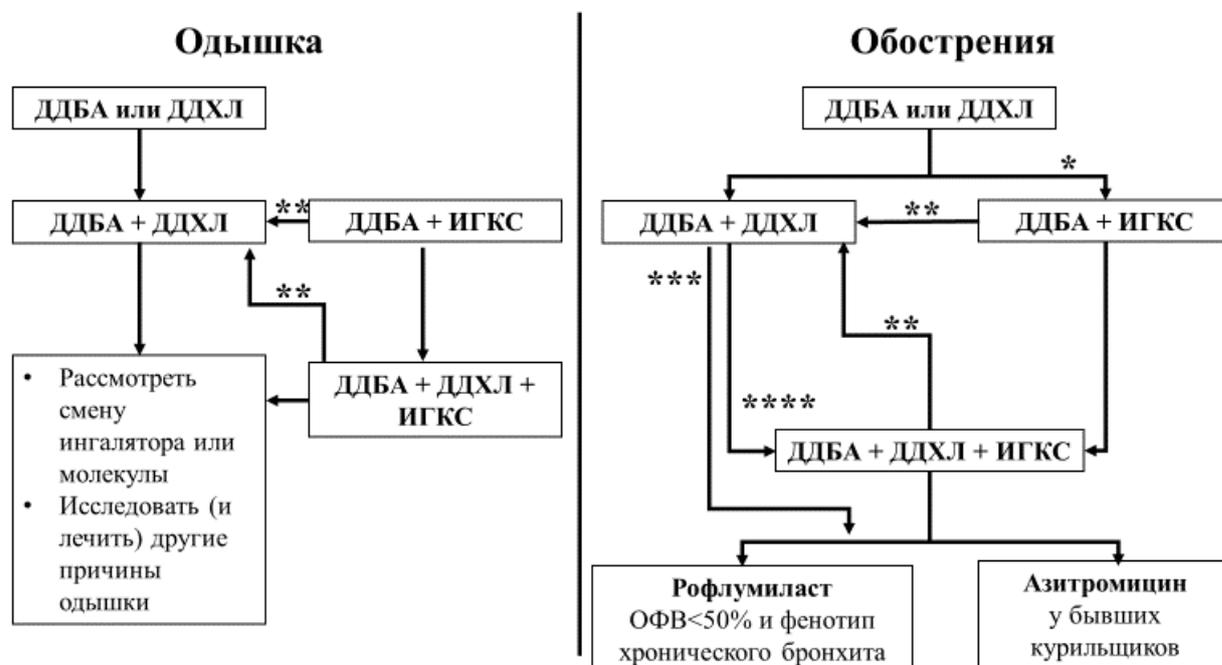
В соответствии с рекомендациями GOLD первоначальный объем терапии зависит от группы, определяемой в соответствии с комбинированной оценкой симптомов и риска обострений.

Так для группы А предлагается использовать в качестве начальной терапии коротко- или длительно действующий бронхолитик, в то время как для групп В, С и D терапия должна начинаться с длительно действующих бронходилататоров (ДДБД), при этом, предпочтение отдается длительно действующим холинолитикам (ДДХЛ), с использованием короткодействующих по потребности.

В случае недостаточной эффективности терапии проводится её эскалация с добавлением второго ДДБД, обычно длительно действующего бета-агониста (ДДБА), и ингаляционных кортикостероидов (ИГКС), предпочтительно при наличии эозинофилии в мокроте.

В случае недостаточного ответа на комбинацию ДДХЛ+ДДБА в сочетании с/без ИГКС рекомендуется добавление рофлумиласта для больных с выраженной

бронхообструкцией и преобладанием клиники хронического бронхита или длительная терапия азитромицином, предпочтительная для бывших курильщиков (рисунок 4).



**Примечание:** \* - рассмотреть если содержание эозинофилов  $\geq 300$  или  $\geq 100$  и  $\geq 2$  обострений средней тяжести/1 госпитализация; \*\* - рассмотреть деэскалацию ИГКС или отменить в случае развития пневмонии, некорректного исходного назначения или отсутствии эффекта; \*\*\* рассмотреть если эозинофилов  $< 100$ ; \*\*\*\* рассмотреть если эозинофилов  $\geq 100$

Рисунок 4 – схема терапии ХОБЛ стабильного течения и при обострении

(цит. по: GOLD, 2019)

В настоящее время медикаментозное лечение ХОБЛ преимущественно связано с использованием ДДБД, которые обеспечивают улучшение дыхательной функции, снижают продукцию мокроты (ДДХЛ), однако обладают слабым противовоспалительным действием, что позволяет эффективно их использовать лишь у части больных [6,30,111,224]. Раскрытие механизма стероид резистентности при ХОБЛ, связанное с инактивацией деацетилазы гистонов вследствие окислительного повреждения, привело к сужению показаний к назначению ИГКС, обладающих противовоспалительным эффектом, в виде фенотипа ХОБЛ с эозинофилией и фенотипа сочетания БА и ХОБЛ [30,89,111,235]. Применение селективного ингибитора ФДЭ-4 рофлумиласта, точкой приложения

которого является воспаление, так же ограничено преимущественно фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями [30,111].

Примечательно, что из всех перечисленных лекарственных препаратов лишь для рофлумиласта установлено влияние на митохондриальную дисфункцию, как точку приложения в патогенезе ХОБЛ. Так, в исследовании Sun Young Kyung et al. на клеточной культуре эпителия бронхов установлено, что воздействие экстракта табачного дыма приводит к развитию митохондриальной дисфункции, которая определялась по снижению мембранного потенциала митохондрий. Развитие митохондриальной дисфункции сопровождалось индукцией апоптоза эпителиоцитов, обусловленного увеличением содержания факторов митохондриального разделения DRP1 и митофагии PINK1. В этих условиях применение рофлумиласта снижало продукцию митохондриальных АФК в клетках, обработанных экстрактом табачного дыма, а также было связано со снижением экспрессии белков-регулирующих митофагию – DRP1 и PINK1. В связи с этим авторы исследования делают вывод, что селективный ингибитор ФДЭ-4 способен оказывать цитопротективный эффект против воздействия табачного дыма через ингибирование митохондриального расщепления [221].

Наряду с этим открытием, Julia Möllmann et al. установили, что рофлумиласт способствует митохондриальному биогенезу в гепатоцитах мышей через повышение экспрессии PGC-1 $\alpha$ , что связано с улучшением толерантности к глюкозе и увеличением чувствительности к инсулину [220].

Крайне большой интерес вызывает работа Coen H. Wiegman et al., демонстрирующая митохондриально-ориентированный подход терапии ХОБЛ. В рамках исследования было установлено наличие митохондриальной дисфункции в культуре клеток гладкой мускулатуры стенки бронхов больных ХОБЛ и клетках легких мышей, подвергнутых воздействию озона. В ответ на применение митохондриально-ориентированных антиоксидантов MitoQ и Tiron в культуре клеток больных ХОБЛ наблюдалось уменьшение выработки провоспалительных цитокинов и снижение интенсивности пролиферации, что имеет важное значение в процессах ремоделирования бронхов при ХОБЛ. Наряду с этим применение

митохондриально-ориентированных антиоксидантов у мышей, подвергшихся действию озона, значительно снижало выраженность гиперреактивности дыхательных путей и интенсивность воспаления в лёгких [171]. По мнению Соеп Н. Wiegman et al. назначение митохондриально-ориентированной антиоксидантной терапии при ХОБЛ способно предупредить воспалительные процессы и ремоделирование легких, что в настоящее время не является точкой приложения терапии [171]. Целесообразность исследования митохондриально-ориентированных оксидантов, способных повлиять на окислительный стресс при ХОБЛ, определяется так же тем, что митохондриальная дисфункция у крайне тяжелых больных ХОБЛ может сохраняться и самоподдерживаться даже после длительного отсутствия экспозиции сигаретного дыма [182]. В тоже время данные о выраженности митохондриальной функции у больных ХОБЛ с различным уровнем функции легких, стажем курения, количеством симптомов и риском обострений практически не встречаются в литературе.

А. Agrawal и U. Mabalirajan в своем обзоре суммировали возможные подходы к коррекции митохондриальных нарушений (рисунок 5). Применение митохондриально-ориентированных антиоксидантов относится лишь к одной из возможных стратегий коррекции митохондриальных нарушений, которая направлена на восстановление работы митохондрий через нейтрализацию избытка АФК. Так помимо MitoQ и Tigon, авторами упоминаются MitoTEMPO, который продемонстрировал эффективность защиты митохондрий от воздействия табачного дыма, и сульфорафан, антиоксидантный эффект которого опосредовано с активацией Nrf2 [124,127,157].

Другим подходом к коррекции митохондриальной дисфункции является репрограммирование. Этот подход направлен на усиление митохондриального биогенеза и может реализовываться несколькими путями. Среди них к наиболее доступным относят физические упражнения, диета и прием метформина [44]. В то время как физические упражнения считаются важной частью реабилитации больных хроническими обструктивными заболеваниями легких, диеты с повышенным содержанием ресвератрола или L-аргинина в настоящее время еще

активно не применяются, несмотря на потенциальную пользу, продемонстрированную в экспериментальных моделях [132,188].

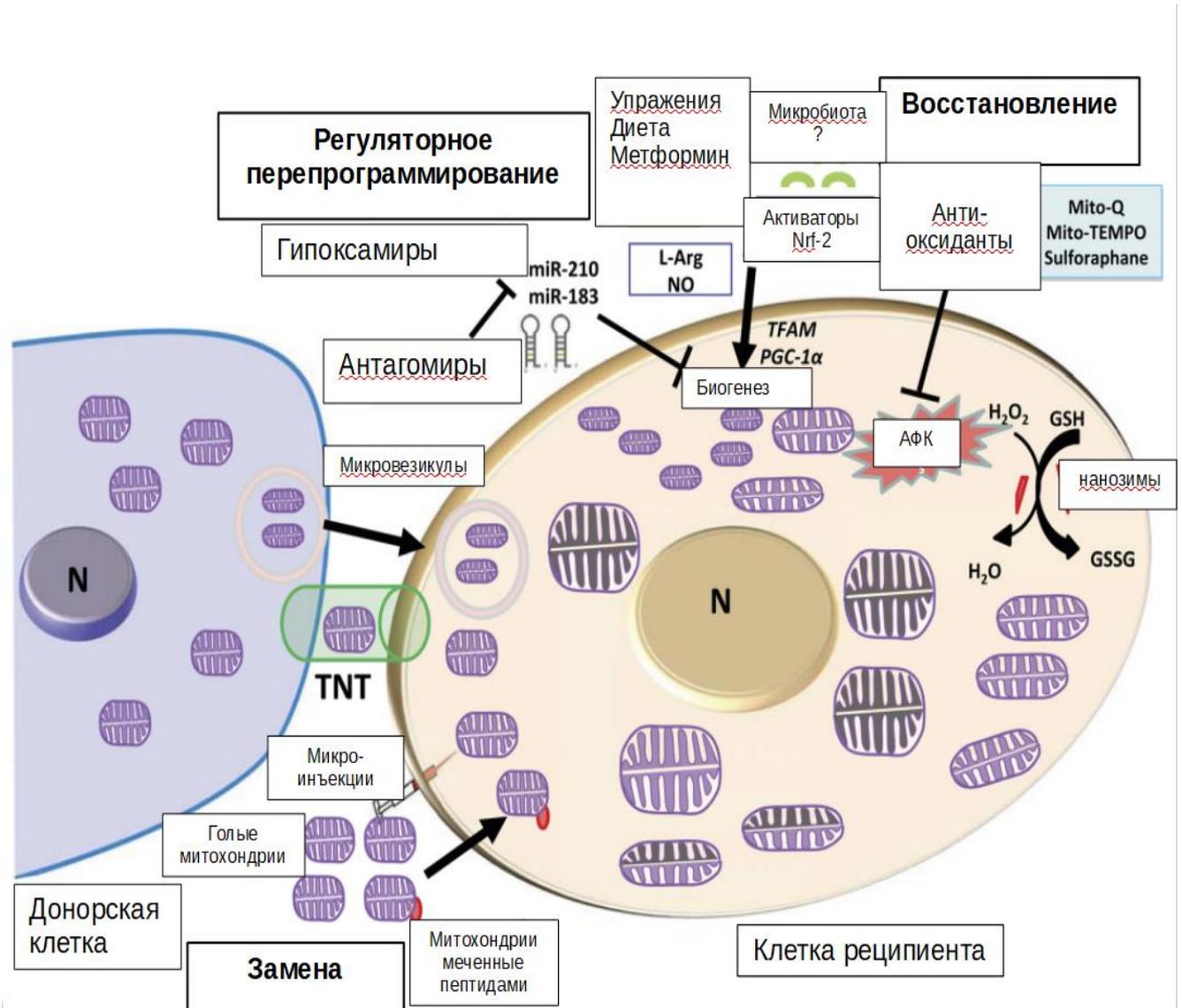


Рисунок 5 – возможные подходы к коррекции митохондриальной дисфункции (цит. по: Agrawal A., Mabalirajan U., 2016)

Исследования, посвященные применению метформина у больных с ХОБЛ, демонстрируют положительный эффект, связанный с улучшением симптомов и улучшением функционирования дыхательных мышц у больных с нарушением толерантности к глюкозе и сахарным диабетом 2 типа [45,194,189]. Наряду с этим, Andrew W. Hitchings et al. указывает, что при тяжелом обострении ХОБЛ у больных, не страдающих диабетом терапевтический эффект от приема метформина в дозе 2 г/сутки отсутствует [146].

Менее доступными методами регуляторного репрограммирования митохондрий являются подходы, связанные с использованием митохондриальных РНК – гипоксамиры, влияющие на реализацию ответа при гипоксии, и митомиры, изменяющие митохондриальную динамику [84,97].

К третьей группе подходов коррекции митохондриальной дисфункции A. Agrawal относит замену митохондрий в клетках, которая может осуществляться различными путями и имеет возможный терапевтический потенциал [94].

Таким образом, существуют экспериментальные предпосылки для исследования новых, митохондриально-ориентированных подходов терапии ХОБЛ. В тоже время, подавляющая часть исследований, посвященная митохондриальным нарушениям, индуцированным табачным дымом связана с моделями животных или клеточными культурами. В связи с этим выявление вторичной митохондриальной дисфункции непосредственно у больного с ХОБЛ в клинической практике может быть использовано в качестве биомаркера специфического эндотипа и назначения митохондриально-ориентированной терапии.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Общая характеристика исследования

Исследование проводилось на базе кафедры факультетской терапии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, на базе кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, на базе Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница» совместно с научно-клиническим центром гематологии, онкологии и иммунологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, на базе ГБУ «Поликлиника №6».

В исследование были включены всего 107 субъектов, разделенных на 3 группы:

1-я группа - больные с ХОБЛ, госпитализированные для стационарного лечения в пульмонологическое отделение Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Областная клиническая больница» по поводу обострения с 2017 по 2018 годы с верифицированным диагнозом «Хроническая обструктивная болезнь легких» - 58 человек;

2-я группа – больные, обратившиеся по поводу обострения хронического бронхита в ГБУ «Поликлиника № 6», с 2017 по 2018 годы, с верифицированным диагнозом «Хронический бронхит» - 24 человек;

3-я группа - здоровые добровольцы - 25 человек.

Основанием для включения в исследование служило подписанное информационное согласие.

Критериями включения в исследования служили:

- для 1-й группы: возраст от 40 до 80 лет, исходный постбронходилатационный показатель  $ОФВ_1/ФЖЕЛ \leq 0,7$ ;
- для 2-й группы: возраст от 40 до 80 лет, наличие хронического бронхита в анамнезе более 2х лет;

- Для 3-й группы: возраст от 40 до 80 лет, отсутствие задокументированных хронических заболеваний легких и сердечно-сосудистой системы в анамнезе.

Критерии исключения из исследования для всех групп явились:

- хирургические вмешательства на легких в анамнезе;
- злоупотребления алкоголем и наркотическими веществами, наличие в анамнезе психических расстройств;
- заболевания легких отличные от ХОБЛ и хронического бронхита у пациентов;
- 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 заболевания 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 комплексная оценка частоты обострений и выраженности симптомов проводились на основании клинико-anamnestических данных, объективного обследования пациента, данных спирографии в соответствии с критериями GOLD, пересмотра 2017 года.

Артериальную гипертензию классифицировали в соответствии с клиническими рекомендациями по диагностике и лечению артериальной гипертензии [15].

Все обследования проводились на добровольной основе с согласия участников исследования. После подписания информированного согласия проводилась оценка соответствия участников исследования критериям включения и исключения.

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.

## **2.2. Клиническая характеристика исследуемых групп**

В соответствии с данными, представленными в таблице 1, в группе больных с ХОБЛ доля мужчин составила 83%, женщин 17%.

Группами сравнения служили 24 больных с обострением хронического бронхита, включавшими мужчин 54% и 46% женщин, и 25 здоровых добровольцев, половой состав которых был представлен 48% женщин и 52% мужчин.

Преобладание в половом составе мужчин в группе ХОБЛ не противоречило ранее установленным закономерностям данного заболевания в других регионах Российской Федерации [7].

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.

В соответствии с классификацией ХОБЛ GOLD в зависимости от выраженности бронхобструкции, определенной методом спирометрии, были выделены подгруппы ХОБЛ 2 (46,5%) и ХОБЛ 3 (53,5%). Больные с хроническим бронхитом не имели обструктивных нарушений.

В соответствии с выраженностью симптомов, оцененных с помощью опросников mMRC и CAT, и частотой обострений используемых для комплексной оценки пациентов с ХОБЛ были выделены группы риска В (31%), С (34,5%), и D (34,5%).

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]
Пол:			
мужской	48	13	13
женский	9	11	12
Курение:			
курильщики	34	24	0
экс-курильщики	24	0	0
не курившие ранее	0	0	25
Индекс пачко-лет:			
Всей группы			
Курильщиков	25[20;30]	15[10;20]*	-
Экс-курильщиков	25[20;30]	15[10;20]*	-
	25[15;30]	-	-
Группы ХОБЛ по ОФВ <sub>1</sub> :			
ХОБЛ <sub>2</sub>	27	-	
ХОБЛ <sub>3</sub>	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

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

Больные с ХОБЛ отличались статистически значимым снижением  $SpO_2$  и  $ОФВ_1$ , что было обусловлено преимущественно обструктивными нарушениями дыхательных путей и развитием дыхательной недостаточности.

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.

Для оценки взаимосвязи выраженности митохондриальной дисфункции и функциональных нарушений при ХОБЛ больные основной группы были разделены на 2 подгруппы в соответствии с показателем объема форсированного выдоха за 1 секунду по классификации степени тяжести GOLD.

Группы больных ХОБЛ, разделенные в соответствии с выраженностью бронхообструкции, были сопоставимы по возрасту и стажу курения (таблица 2).

Доля лиц женского пола в группе ХОБЛ 2 (30%) была выше по сравнению с долей лиц женского пола в группе ХОБЛ 3 (6%).

В группе больных с умеренно-выраженной бронхообструкцией наблюдалось меньшее количество больных группы D (26%) в сравнении с группой больных с тяжелой бронхообструкцией (42%). Количество пациентов с частыми обострениями, определяемыми, как  $\geq 2$  эпизодов обострений в обеих группах, было сопоставимо (66,7 % и 67,7%) [2,30,33].

Показатели  $SpO_2$  группы больных ХОБЛ 3 были статистически значимо более низкими, что, вероятно, было обусловлено более выраженными обструктивными нарушениями.

Доля больных с сопутствующей гипертонической болезнью 2 стадии была сопоставима в группах ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3 (66,7% и 67% соответственно).

В группе больных с тяжелой ХОБЛ доля пациентов, получавших ДДБА в комбинации с ДДХЛ, была выше (58%) в сравнении с группой больных ХОБЛ с умеренно-тяжелой бронхообструкцией (30%).

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]
Пол: мужской женский	19 8	29 2
Результаты комплексной оценки ХОБЛ: В С D	9 11 7	9 9 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 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>.

До госпитализации пациенты группы В получали ДДБА в 39% случаев, группы С в 25% случаев, группы D в 85% случаев, что не противоречит текущим положениям GOLD и клиническим рекомендациям [2,5,218] (таблица 3).

Таблица 3 - Клинико-функциональные характеристики исследуемых групп больных ХОБЛ, разделенных в соответствии с выраженностью симптомов и частотой обострений

Показатель	ХОБЛ группа В, n=18 (1)	ХОБЛ группа С, n=20 (2)	ХОБЛ группа D, n=20 (3)
Прием ДДХЛ	18	20	20
Прием ДДБА	7	5	17
ИПЛ	25[20;30] p <sub>1-2</sub> =1,0; p <sub>1-3</sub> =1,0;	25[20;30] p <sub>2-3</sub> =1,0;	22[20;28]
ОФВ <sub>1</sub> , %	48[38;63] p <sub>1-2</sub> =1,0; p <sub>1-3</sub> =1,0;	55[39;62] p <sub>2-3</sub> =1,0;	45[40;58]
SpO <sub>2</sub> , %	92[91;93] p <sub>1-3</sub> =1,0; p <sub>1-3</sub> =0,36;	92[91;94] p <sub>2-3</sub> =0,96;	91[87;93]
mMRC, балл	2[1;4]; p <sub>1-2</sub> =0,0001	1[1;1]; p <sub>2-3</sub> <0,0001	3[2;5]
САТ, балл	19[12;31]; p <sub>1-2</sub> <0,0001	8[6;9]; p <sub>2-3</sub> <0,0001	28[12;34]

Группа исследуемых ХОБЛ с частыми обострениями была сопоставима с группой ХОБЛ без частых обострений по уровню ОФВ<sub>1</sub>, выраженности гипоксемии и стажу курения (таблица 4).

Таблица 4 - Клиническая характеристика сравниваемых групп больных

Исследуемые показатели	ХОБЛ с частыми обострениями и n=18 (1)	ХОБЛ без частых обострений n=40 (2)	Хронический бронхит n=24 (3)	Здоровые добровольцы n=25 (4)
ОФВ <sub>1</sub> , %	48[40;61] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	48[38;63] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	92[89;94] p <sub>3-4</sub> =1,0;	93[92;95]
SpO <sub>2</sub> , %	92[89;93] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	92[91;93] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	97[96;98] p <sub>3-4</sub> =1,0;	97[97;98]
ИПЛ, пачко-лет	25[20;30] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,08	25[20;30] p <sub>2-3</sub> =0,25	15[10;20]	0

Для изучения механизмов быстрой адаптации к гипоксии и показателей оксидативного стресса больные с ХОБЛ были разделены на группы сопоставимые по уровню бронхобструкции, SpO<sub>2</sub> и индексу пачко-лет (таблица 5).

Таблица 5 - Клиническая характеристика исследуемых групп

Исследуемые показатели	ХОБЛ курильщик n=34	ХОБЛ экскурильщик n=24
ОФВ <sub>1</sub> , %	45[35;61]	51[43;62]
SpO <sub>2</sub> , %	92[89;93]	92[91;94]
ИПЛ, пачко-лет	25[20;30]	25[15;30]

Определение митохондриального мембранного потенциала проводилось у 34 исследуемых, детальная характеристика которых приведена в таблице 6. Больные

в группе сравнения и в контрольной группе, представленной здоровыми некурящими добровольцами, были сопоставимы по возрасту.

Таблица 6 - 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
мужчины	4	8	9
женщины	4	4	5
ОФВ1, 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]

В структуре групп больных с ХОБЛ преобладали мужчины. 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  $ОФВ_1$ . Больные группы D отличались статистически значимым снижением показателя  $SpO_2$ , что отражало более выраженную гипоксемию (таблица 7).

Таблица 7 - Клиническая характеристика групп больных ХОБЛ, выделенных в зависимости от выраженности симптомов и частоты обострений, которым проводилось определение мембранного потенциала митохондрий методом проточной цитометрии

Показатель	ХОБЛ группа В, n=11 (1)	ХОБЛ группа С, n=7 (2)	ХОБЛ группа D, n=8 (3)
Возраст	62[53;76]; $p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-3}=1,0$ ;	64[62;80] $p_{2-3}=0,97$ ;	64[50;69]
ИПЛ, пачко-лет	25[25;30]; $p_{1-2}=0,85$ ; $p_{1-3}=0,61$ ;	25[20;25] $p_{2-3}=0,097$ ;	35[25;40]
$ОФВ_1$ , %	54[45;67]; $p_{1-2}=0,73$ ; $p_{1-3}=0,3$ ;	51[43;54] $p_{2-3}=1,0$ ;	45[41;57]
$SpO_2$ , %	92[91;93]; $p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-3}=0,02$ ;	93[92;94] $p_{2-3}=0,003$ ;	87[86;89]

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

Всем пациентам проводилось общеклиническое обследование, лабораторное исследование, включающее общеклинический анализ крови для исключения моноцитоза, выполнена оценка функции внешнего дыхания (спирометрия), проведены биохимические исследования уровня окислительной модификации белков, активности супероксиддисмутазы и сукцинатдегидрогеназы, концентрации сукцината, уровня мембранного потенциала митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови.

Обследование проводилось на второй день госпитализации в утренние часы. Определение сатурации кислорода в крови проводилось с помощью пульсоксиметра SpirotelSpO<sub>2</sub>. Исследование функции внешнего дыхания проводилось с помощью спирографа MicroLab (Micro Medical, Великобритания). При исследовании определялись основные дыхательные объемы (ОФВ<sub>1</sub>, ФЖЕЛ, соотношение ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ).

#### **2.3.1. Определение биохимических показателей функционирования митохондрий**

На второй день госпитализации утром натощак путём венепункции осуществлялся забор крови с помощью пробирок BD CPT, содержащих разделительный гель, раствор фиколла для создания градиента плотности, гепарин натрия (BD Vacutainer CPT, США).

Выделение мононуклеарных лейкоцитов из крови проводилось путем центрифугирования забранной крови в пробирках BD CPT при относительном центробежном ускорении 1600 (G) в течение 16 минут согласно инструкции производителя.

После центрифугирования отделяли плазму с мононуклеарными лейкоцитами из содержимого пробирки над градиентом. Лимфоциты и моноциты осаждали путем центрифугирования при 3000 оборотах/минуту в течение 10 минут. Выделенные клетки отмывали теплым (37<sup>0</sup>) 0,9% NaCl с последующим центрифугированием при 3000 оборотах/минуту в течение 5 минут троекратно.

Выделенные мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в 1 мл дистиллированной воды получая суспензию. В 20 мкл суспензии подсчитывали количество клеток, окрашенных раствором метиленового синего в камере Горяева с последующим их перерасчетом на объем суспензии. После расчёта концентрации клеток к 1 мл суспензии добавляли детергент (10 мкл Triton X-100) и замораживали её. После разморозки суспензию однократно использовали для определения показателей окислительного стресса, концентрации янтарной кислоты и активности ферментов с последующим пересчетом показателей на  $10^6$  клеток/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  $\lambda=420$  [20]. 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 [3]. 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 2,4-динитрофенилгидразонов (ДНФГ) характерны специфические спектры поглощения в видимой и ультрафиолетовой части [24,34]. 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 [24,34,35]. Полученные значения выражали в условных единицах на  $10^6$  клеток 1 мл суспензии.

Указанный метод позволял измерить суммарное содержание карбонильных производных белков по общей площади под кривой S ОМБ и определить долю первичных и вторичных показателей ОМБ. Маркерами фрагментации (первичными) окислительной модификации белков являются альдегиды. Их количество характеризует сумма  $SA_{ДНФГ} = SA_{ДНФГ_{uv}} + SA_{ДНФГ_{vis}}$ . Маркерами агрегации (вторичными) являются кетоны. Их количество отражает сумма  $SK_{ДНФГ} = SK_{ДНФГ_{uv}} + SK_{ДНФГ_{vis}}$ . Долю первичных и вторичных маркеров вычисляли как процент  $SA_{ДНФГ}$  и  $SK_{ДНФГ}$  от  $S_{ОМБ}$ . Помимо определения спонтанной ОМБ, оценивали резервно-адаптационный потенциал (РАП ОМБ). Для этого из 100% вычитали значение, полученное при вычислении отношения  $S_{СП ОМБ} / S_{МК ОМБ}$ .  $S_{МК ОМБ}$  принимали за 100%. Результаты интерпретировали так: чем больше доля СП ОМБ, тем ниже РАП [24,34,35].

### **2.3.2. Определение мембранного потенциала митохондрий методом проточной цитофлуориметрии**

Для исследования мембранного потенциала митохондрий моноядерные клетки выделяли путем центрифугирования в пробирках с разделительным гелем (BD Vacutainer СРТ, США). При этом полученные клетки подсчитывали на гемоцитометре SysmexХТ-2000i (Япония). Проточную цитофлуориметрию осуществляли на цитометре Cytomics FC 500 (США) с использованием программного обеспечения СХР.

Определение разности потенциалов внутренней мембраны митохондрий (протонного потенциала; мембранного потенциала митохондрий;  $\Delta\psi$ ) проводилось методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентного катионного красителя JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлор-1,1',3,3'-тетраэтилбензи-мидазолкарбоцианин

йодида) с использованием набора MitoProbe™ JC-1 Assay Kit («Molecular Probes», США).

Радиомерический метод определения  $\Delta\psi$  основан способности JC-1 накапливаться в зависимости от уровня  $\Delta\psi$  внутри митохондрий с образованием агрегатов, для которых характерна флуоресцентная эмиссия с максимумом интенсивности в красном-оранжевом спектре ( $\approx\lambda = 590$  нм). Мономеры JC-1 характеризуются максимумом интенсивности эмиссионной флуоресценции в зеленом спектре ( $\approx\lambda = 529$  нм). В изучаемых образцах определяли отношение интенсивности красной флуоресценции к зеленой (FL-2/FL-1; Red/Green), которое принимали за относительную величину разности потенциалов внутренней мембраны митохондрий ( $\Delta\psi$ , мембранный потенциал митохондрии). Чем больше соотношение FL-2/FL-1, тем больше  $\Delta\psi$  [83].

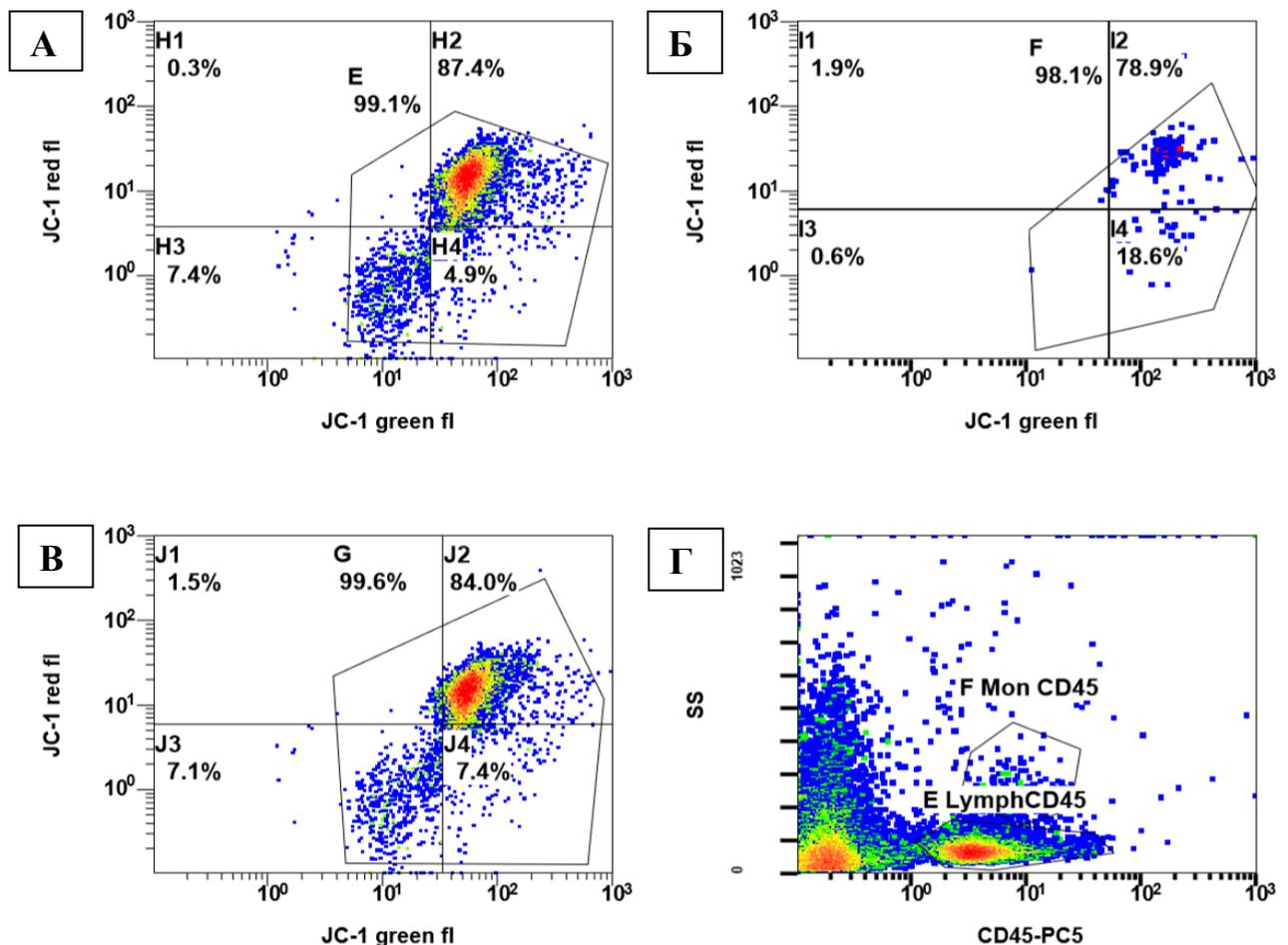


Рисунок 6 – Точечные диаграммы рассеяния по результатам проточной цитофлуориметрии

Отношение интенсивности красной флуоресценции к зеленой определялось в регионах, выделенных по показателям бокового светорассеивания (SS) и интенсивности сигнала флуоресцентной метки к CD45 на канале FL-4 (рисунок 6).

На рисунке 6 обозначены:

- JC-1 red fl – канал FL-2, с помощью которого определяется интенсивность красной флуоресценции (агрегаты JC-1)
- JC-1 green fl – канал FL-1, с помощью которого определяется интенсивность зеленой флуоресценции (мономеры JC-1)
- SS – показатель бокового светорассеивания, определяет гранулярность клеток
- CD45-PC5 – показатель определяющий интенсивность флуоресценции меченых флуорохромом антител к CD45 (общий для мононуклеарных лейкоцитов антиген)

Под буквами размещены соответствующие диаграммы:

А) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтом Е, которой соответствует популяция лимфоцитов

Б) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтом F, которой соответствует популяция моноцитов

В) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтом F, которой соответствует популяция мононуклеарных лейкоцитов (моноциты+лимфоциты)

Г) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтами:

- Е - в который выделена популяция клеток с низким показателем гранулярности и высоким показателем CD45, предположительно лимфоциты
- F - в который выделена популяция клеток с высоким показателем гранулярности и высоким показателем CD45, предположительно моноциты.

Каждому исследованию ставилась контрольная проба с дизраптором митохондриального дыхания CCCP, что сопровождалось значительным снижением уровня красной флуоресценции в исследуемых популяциях клеток (рисунок 7).

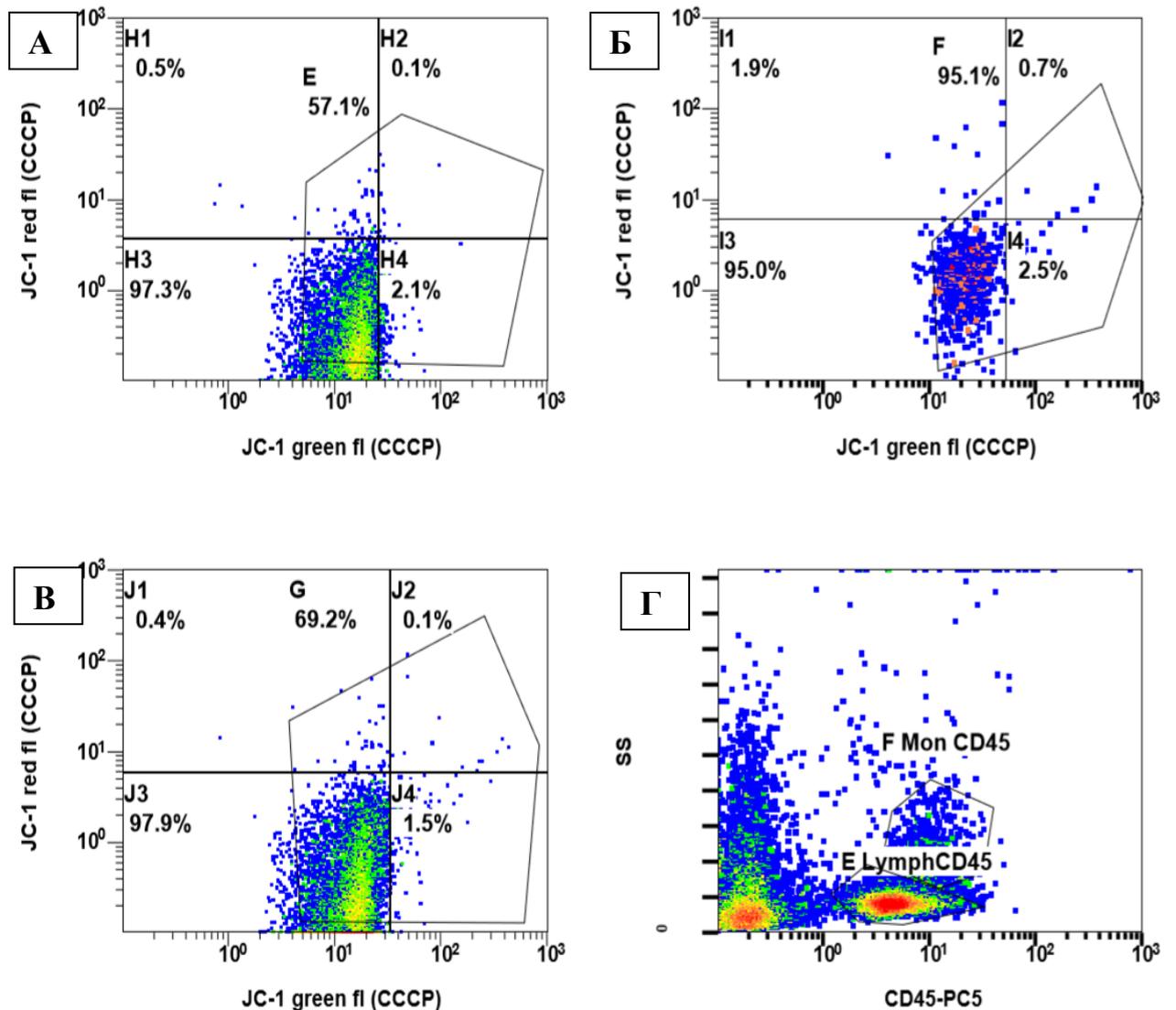


Рисунок 7 – Точечные диаграммы рассеяния пробы с CCCP

На рисунке 7 обозначены:

JC-1 red fl (CCCP) – канал FL-2, с помощью которого определяется интенсивность красной флуоресценции (агрегаты JC-1)

JC-1 green fl (CCCP) – канал FL-1, с помощью которого определяется интенсивность зеленой флуоресценции (мономеры JC-1)

SS – показатель бокового светорассеивания, определяет гранулярность клеток

CD45-PC5 – показатель определяющий интенсивность флуоресценции меченых флуорохромом антител к CD45 (антиген общий для мононуклеарных лейкоцитов)

А) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтом Е, которому соответствует популяция лимфоцитов

Б) на рисунке изображена точечная диаграмма плотности с гейтом F, которому соответствует популяция моноцитов

В) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтом F, которому соответствует популяция мононуклеарных лейкоцитов (моноциты+лимфоциты)

Г) на рисунке изображена точечная диаграмма с гейтом Е, в который выделена популяция клеток с низким показателем гранулярности и высоким показателем CD45, предположительно лимфоциты, и с гейтом F, в который выделена популяция клеток с высоким показателем гранулярности и высоким показателем CD45, предположительно моноциты.

#### **2.4. Статистическая обработка полученных результатов**

Сбор и формирование таблиц проводили с помощью программ Microsoft Office Excel 365, статистическую обработку результатов с помощью программы StatSoft Statistica 10.0. Для оценки нормальности распределения в группах размером  $n < 50$  использовали критерий Шапиро-Уилка, в группах с размером  $n > 50$  – критерий Колмогорова-Смирнова [9]. 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). При ненормальном распределении для 2-х групп оценку значимости различий проводили с использованием критерия Манна-Уитни. При ненормальном распределении для множественных сравнений использовали критерий Краскела-Уолли, с последующим попарным сравнением с применением критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. При нормальном распределении и отсутствии различий дисперсий использовались однофакторный дисперсионный анализ с последующим

использованием критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений, для сравнения 2-х групп - критерий Стьюдента [8]. Анализ корреляционных взаимосвязей осуществлялся с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали отличия исследуемых показателей при вероятности нулевой гипотезы об отсутствии различий  $p < 0,05$ .

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 3.1. 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 и в популяции лимфоцитов, повышенный уровень окисленно поврежденных белков (СП ОМБ) и сниженный резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков (РАП ОМБ) (на 45 %,  $p=0,0004$ ) (таблица 8).

Таблица 8 - Показатели функционирования митохондрий у больных с обострением ХОБЛ и в группе здоровых добровольцев

Исследуемый показатель	Здоровые добровольцы, n=8	ХОБЛ, n=26
$\Delta\psi$ , лейкоциты (гейт G)	0,247±0,028	0,171±0,040 ↓ на 31%, $p=0,000023$
$\Delta\psi$ , лимфоциты (гейт E)	0,254±0,028	0,180±0,054 ↓ на 29%, $p=0,000847$
$\Delta\psi$ , моноциты (гейт F)	0,109[0,078;0,189]	0,103[0,086;0,125]
СП ОМБ, у.е./ на $10^6$ клеток 1 мл суспензии	24[15;49]	217[107;298] ↑ в 9 раз, $p=0,0002$
РАП ОМБ, %	79,32±11,46	43,34±24,94 ↓ на 45 %, $p=0,0004$

Полученные результаты указывают на значительное снижение мембранного потенциала митохондрий моноклеарных лейкоцитов и развитие вторичной митохондриальной дисфункции лейкоцитов при обострении ХОБЛ. Это создавало предпосылки для нарушения функционирования моноклеарных лейкоцитов, преимущественно лимфоцитов, и развития в них проапоптотических процессов (рисунок 8) [40].

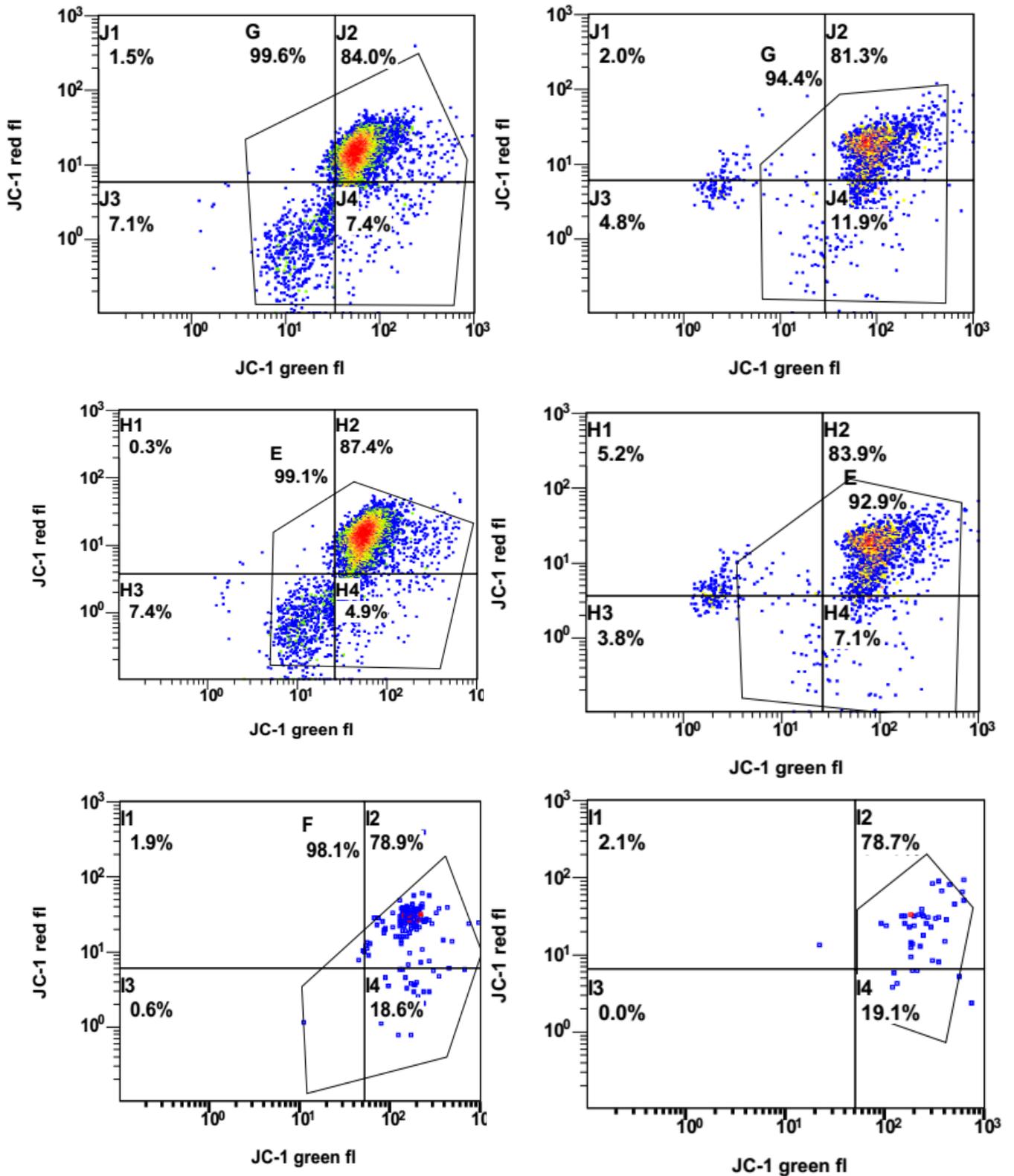


Рисунок 8 – результаты определения мембранного потенциала митохондрий в популяциях моноядерных лейкоцитов крови здорового добровольца (слева) и пациента с обострением ХОБЛ (справа)

На рисунке 8 латинскими буквами обозначены исследуемые популяции клеток: гейт G – моноядерные лейкоциты (лимфоциты+моноциты), гейт E – лимфоциты, гейт F – моноциты. Слева приведены точечные диаграммы интенсивности флуоресценции мономеров (JC-1 green, FL-1) и агрегатов (JC-1 red, FL-2) катионного красителя JC-1 в клетках здорового добровольца. Справа приведены точечные диаграммы результатов проточной цитофлуориметрии больного с обострением ХОБЛ. В клетках группы больных ХОБЛ определяемые события были смещены в область большей интенсивности зеленой флуоресценции.  $\Delta\psi$  моноядерных лейкоцитов определялась как соотношение величин интенсивности красной к зеленой флуоресценции (FL-2/FL-1; Red/Green) определяемых в выделенных гейтах G, E и F соответственно.

Многokратный прирост концентрации спонтанно окисленных белков и выраженное снижение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков подтверждали развитие окислительного стресса в клетках периферической крови, обусловленного вторичной митохондриальной дисфункцией у больных с обострением ХОБЛ, и указывали на их потенциальную значимость как косвенного маркера митохондриальной дисфункции.

Таблица 9 - Активность СДГ и концентрация сукцината моноядерных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ

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] p <sub>2-3</sub> =1,0	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] p <sub>2-3</sub> =1,0	743[689;786]

Исследование показателей адаптации к гипоксии у больных с ХОБЛ при обострении выявило статистически значимое выраженное снижение активности СДГ и значительное уменьшение концентрации сукцината в моноядерных лейкоцитах (таблица 9). Данные изменения указывали на нарушение работы компенсаторных механизмов быстрой адаптации митохондрий к гипоксии [135].

Нарушения адаптационных механизмов к гипоксии сопровождались срывом антиоксидантной защиты клеток, что нашло отражение в значительном снижении активности СОД моноядерных лейкоцитов и согласовывалось с текущими представлениями о нарушении АОС при ХОБЛ (таблица 10) [102]. Снижение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков и многократный прирост окисленно-модифицированных белков, преимущественно за счет маркеров ранней окислительной деструкции, демонстрировали повреждение клеток периферической крови в условиях гипоксемии при обострении ХОБЛ.

Таблица 10 - Показатели окислительного стресса мононуклеарных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ и групп сравнения.

Исследуемые показатели	ХОБЛ n=58 (1)	Хр. бронхит n=24 (2)	Здоровые добровольцы n=25 (3)
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] p <sub>2-3</sub> =1,0	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] p <sub>2-3</sub> =1,0	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] p <sub>2-3</sub> =1,0	77[66;85]

При проведении комплексной оценки окислительной модификации было установлено, что в структуре поврежденных белков преобладают маркеры ранней окислительной деструкции белков (АДНФГ-дериваты) (таблица 11).

Таблица 11 - Показатели комплексной оценки окислительной модификации белков при ХОБЛ

Исследуемые показатели	ХОБЛ n=58 (1)	Хр. бронхит n=24 (2)	Здоровые добровольцы n=25 (3)
СП S АДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	145[87;218] p <sub>1-2</sub> <0,0001 p <sub>1-3</sub> <0,0001	27[17;43] p <sub>2-3</sub> =1,0	20[14;49]
СП S КДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	54[34;72] p <sub>1-2</sub> <0,0001 p <sub>1-3</sub> <0,0001	12[9;18] p <sub>2-3</sub> =1,0	17[10;24]
СП S АДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	40[26;51] p <sub>1-2</sub> <0,0001 p <sub>1-3</sub> <0,0001	7[3;10] p <sub>2-3</sub> =1,0	6[3;11]
СП S КДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	6[3;9] p <sub>1-2</sub> =0,0003 p <sub>1-3</sub> <0,0001	0,78[0,2;1,8] p <sub>2-3</sub> =1,0	0,5[0,2;0,8]

Сравнение исследуемых клинико-функциональных и биохимических показателей в группах больных ХОБЛ с гипертонической болезнью и ХОБЛ без гипертонической болезни не выявило статистически значимых различий.

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. Все это подтверждает системный характер нарушения функционирования митохондрий, что не противоречит исследованиям других авторов [108, 171,182,233].

### **3.2. Оценка взаимосвязи нарушений функционирования митохондрий моноядерных лейкоцитов у больных ХОБЛ с выраженностью бронхообструкции**

При сравнении показателей групп больных с ХОБЛ, разделенных по стадиям GOLD, выявлено значительное снижение  $\Delta\psi$  в группе больных с тяжелой ХОБЛ (ХОБЛ 3 GOLD) относительно группы здоровых добровольцев, как в популяции лейкоцитов, так и лимфоцитов. При этом в группе ХОБЛ 2 величина  $\Delta\psi$  лейкоцитов и лимфоцитов были больше относительно показателей группы ХОБЛ 3. Уровень показателей окислительного стресса в мононуклеарных лейкоцитах больных ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3 был статистически значимо выше относительно контрольной группы (таблица 12).

Исследование концентрации сукцината и активности СДГ мононуклеаров периферической крови у больных с различной выраженностью обструктивных нарушений не выявило статистически значимых отличий между группами ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3 (таблица 13).

Отличия активности супероксиддисмутазы и маркеров окислительного стресса между группами больных ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3 не носили статистически значимый характер (таблица 14).

Таблица 12 - Показатели функционирования митохондрий мононуклеарных лейкоцитов крови в исследуемых группах

Показатели	Группы		
	Контроль, n=8 (группа 1)	ХОБЛ 2, n=12 (группа 2)	ХОБЛ 3, n=14 (группа 3)
$\Delta\psi$ , лейкоциты (регион G)	0,249±0,0285	0,189±0,032 ↓ <sub>1-2</sub> на 24% p <sub>1-2</sub> =0,0008	0,156±0,041 ↓ <sub>1-3</sub> на 37,35% p <sub>1-3</sub> =0,00013 ↓ <sub>2-3</sub> на 17,5% p <sub>2-3</sub> =0,037
$\Delta\psi$ , лимфоциты (регион E)	0,254±0,0282	0,212±0,044 ↓ <sub>1-2</sub> на 16,5% p <sub>1-2</sub> = 0,03	0,152±0,047 ↓ <sub>1-3</sub> на 40,2% p <sub>1-3</sub> =0,0027 ↓ <sub>2-3</sub> на 28,3%, p <sub>2-3</sub> = 0,00013
$\Delta\psi$ , моноциты (регион F)	0,11[0,08;0,19]	0,0965[0,08;0,11]	0,112[0,087;0,15]
СП ОМБ, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	24,3 [15;49]	190 [96;295] ↑ <sub>1-2</sub> в 7,82 раз p <sub>1-2</sub> =0,0068	226 [197;481] ↑ <sub>1-3</sub> в 9,3 раз p <sub>1-3</sub> =0,00064
РАП ОМБ, %	79,32±11,463	42,2±23,9 ↓ <sub>1-2</sub> на 47%, p <sub>1-2</sub> =0,002	44,32±26,7 ↓ <sub>1-3</sub> на 44% p <sub>1-3</sub> =0,0015

Таблица 13 - Показатели адаптации к гипоксии у больных ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3 относительно контрольной группы

Исследуемые показатели	ХОБЛ 2, n=27 (1)	ХОБЛ 3, n=31 (2)	Хронический бронхит, n=24 (3)	Здоровые добровольцы, n=25 (4)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин * 10 <sup>6</sup> клеток / 1 мл суспензии	41[28;65] p <sub>1-2</sub> =0,53 ↓ <sub>1-3</sub> в 2,5 раз p <sub>1-3</sub> <0,0001; ↓ <sub>1-4</sub> в 2,3 раз p <sub>1-4</sub> <0,0001;	28[13;51] ↓ <sub>2-3</sub> в 3,6 раз p <sub>2-3</sub> <0,0001; ↓ <sub>2-4</sub> в 3,33 раз p <sub>2-4</sub> <0,0001;	102[82;125] p <sub>3-4</sub> =1,0	93[87;98]
Концентрация сукцината, нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток / 1 мл суспензии	375[264;497] p <sub>1-2</sub> =0,13 ↓ <sub>1-3</sub> в 1,97 раз p <sub>1-3</sub> <0,0001; ↓ <sub>1-4</sub> в 1,98 раз p <sub>1-4</sub> <0,0001;	266[185;337] ↓ <sub>2-3</sub> в 2,78 раз p <sub>2-3</sub> <0,0001; ↓ <sub>2-4</sub> в 2,8 раз p <sub>2-4</sub> <0,0001;	739[664;863] p <sub>3-4</sub> =1,0	743[689;786]

Отсутствие статистически значимых отличий показателей комплексной оценки окислительной модификации белков между группами больных ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3, вероятно, указывает на единый механизм развития окислительного стресса в моноядерных лейкоцитах, зависящий от выраженности гипоксемии и неэффективности адаптационных механизмов митохондрий к развитию острой гипоксии (таблица 15).

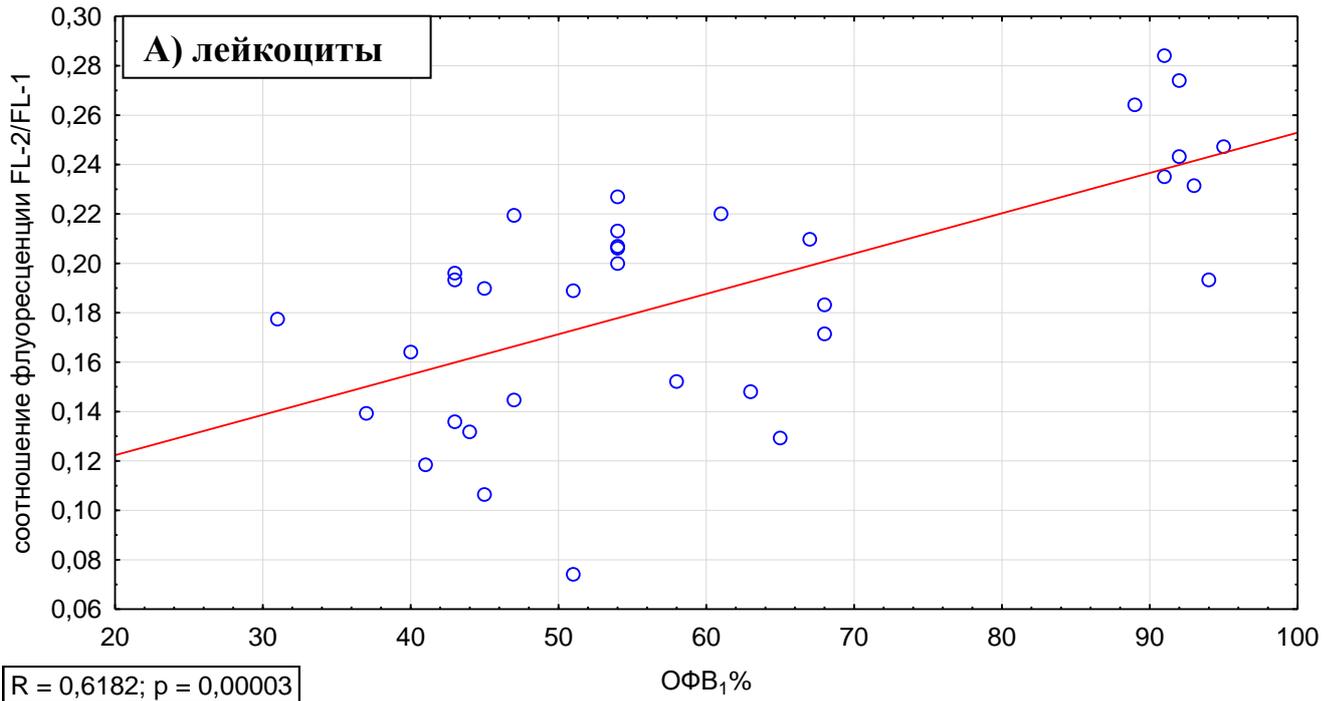
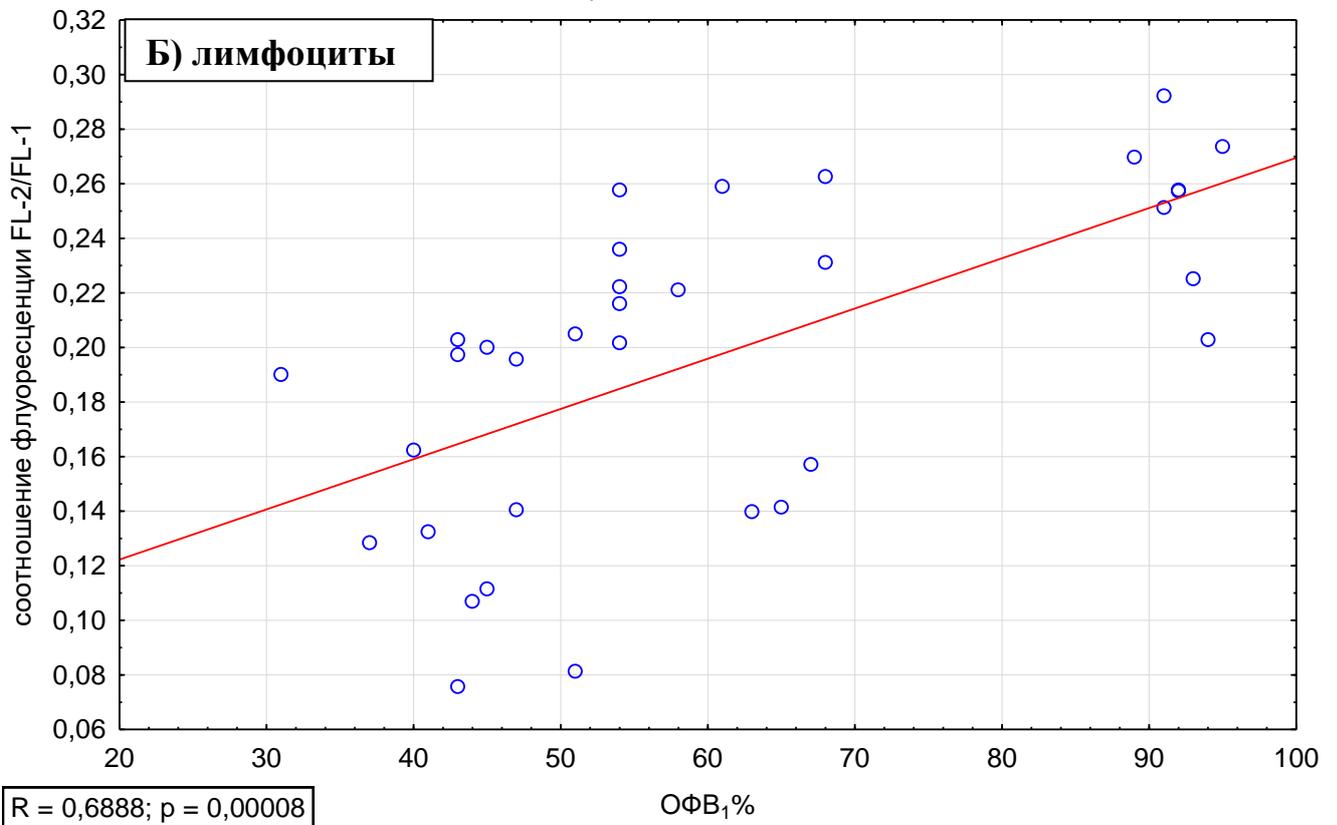
Таблица 14 - Показатели окислительного стресса мононуклеаров крови у  
больных ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3

Исследуемые показатели	ХОБЛ2 N=27 (1)	ХОБЛ3 N=31 (2)	Хронический бронхит n=24 (3)	Здоровые добровольцы n=25(4)
Активность СОД, УЕ/ 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	38[21;45] p <sub>1-2</sub> =0,39 ↓ <sub>1-3</sub> в 2,10 раз p <sub>1-3</sub> <0,0001; ↓ <sub>1-4</sub> в 1,89 раз p <sub>1-4</sub> =0,001;	18[8;34] ↓ <sub>2-3</sub> в 4,44 раз p <sub>2-3</sub> <0,0001 ↓ <sub>2-4</sub> в 4 раз p <sub>2-4</sub> <0,0001	80[74;85] p <sub>3-4</sub> =1,0	72[64;82]
СП ОМБ общая, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	219[140;333] p <sub>1-2</sub> =1,0 ↑ <sub>1-3</sub> в 4,56 раз p <sub>1-3</sub> =0,0002 ↑ <sub>1-4</sub> в 4,38 раз p <sub>1-4</sub> =0,0003	250[199;349] ↑ <sub>2-3</sub> в 5,2 раз p <sub>2-3</sub> <0,0001 ↑ <sub>2-4</sub> в 5 раз p <sub>2-4</sub> <0,0001	48[37;78] p <sub>3-4</sub> =1,0	50[34;91]
РАП ОМБ, %	45[15;65] p <sub>1-2</sub> =1,0 ↓ <sub>1-3</sub> в 1,69 раз p <sub>1-3</sub> =0,013; ↓ <sub>1-4</sub> в 1,71 раз p <sub>1-4</sub> =0,03;	41[21;67] ↓ <sub>2-3</sub> в 1,85 раз p <sub>2-3</sub> =0,0195 ↓ <sub>2-4</sub> в 1,88 раз p <sub>2-4</sub> =0,044	76[65;87] p <sub>3-4</sub> =1,0	77[66;85]

Таблица 15 - Показатели комплексной оценки окислительной модификации белков групп ХОБЛ 2 и ХОБЛ 3

Исследуемые показатели	ХОБЛ 2 n=27 (1)	ХОБЛ 3 n=31 (2)	Хр. бронхит n=24 (3)	Добровольцы n=25(4)
СП S АДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	118[82;217] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,0006 p <sub>1-4</sub> =0,0005	159[100;218] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	27[17;43] p <sub>3-4</sub> =1,0	20[14;49]
СП S КДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	47[32;65] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,0003 p <sub>1-4</sub> =0,0006	62[37;75] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	12[9;18] p <sub>3-4</sub> =1,0	17[10;24]
СП S АДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	31[19;50] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,001 p <sub>1-4</sub> =0,0002	43[34;54] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	7[3;10] p <sub>3-4</sub> =1,0	6[3;11]
СП S КДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	4[2,3;10] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,014 p <sub>1-4</sub> =0,0002	7[3,4;9] p <sub>2-3</sub> =0,0004 p <sub>2-4</sub> <0,0001	0,78[0,2;1,8] p <sub>3-4</sub> =1,0	0,5[0,2;0,8]

Полученные результаты положительной корреляционной связи умеренной силы между показателем ОФВ<sub>1</sub> и уровнем Δψ демонстрируют, что, вероятно, развитие митохондриальной дисфункции мононуклеаров периферической крови, преимущественно лимфоцитов, определяется не только выраженностью бронхообструкции (рисунки 9,10), на основании которой, основана спирометрическая классификация GOLD, но и другими факторами.

Корреляционная зависимость  $\Delta\psi$  митохондрий лейкоцитов крови от ОФВ<sub>1</sub>%Корреляционная зависимость  $\Delta\psi$  митохондрий лимфоцитов крови от ОФВ<sub>1</sub>%

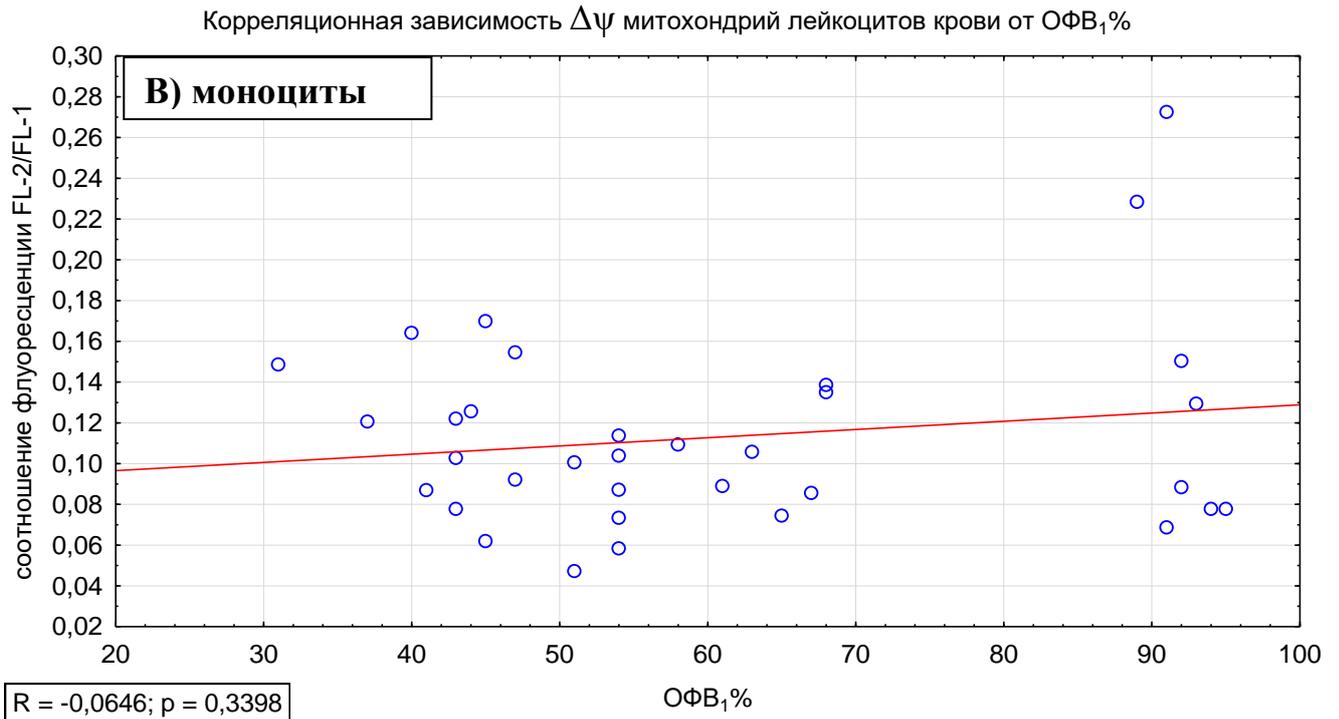
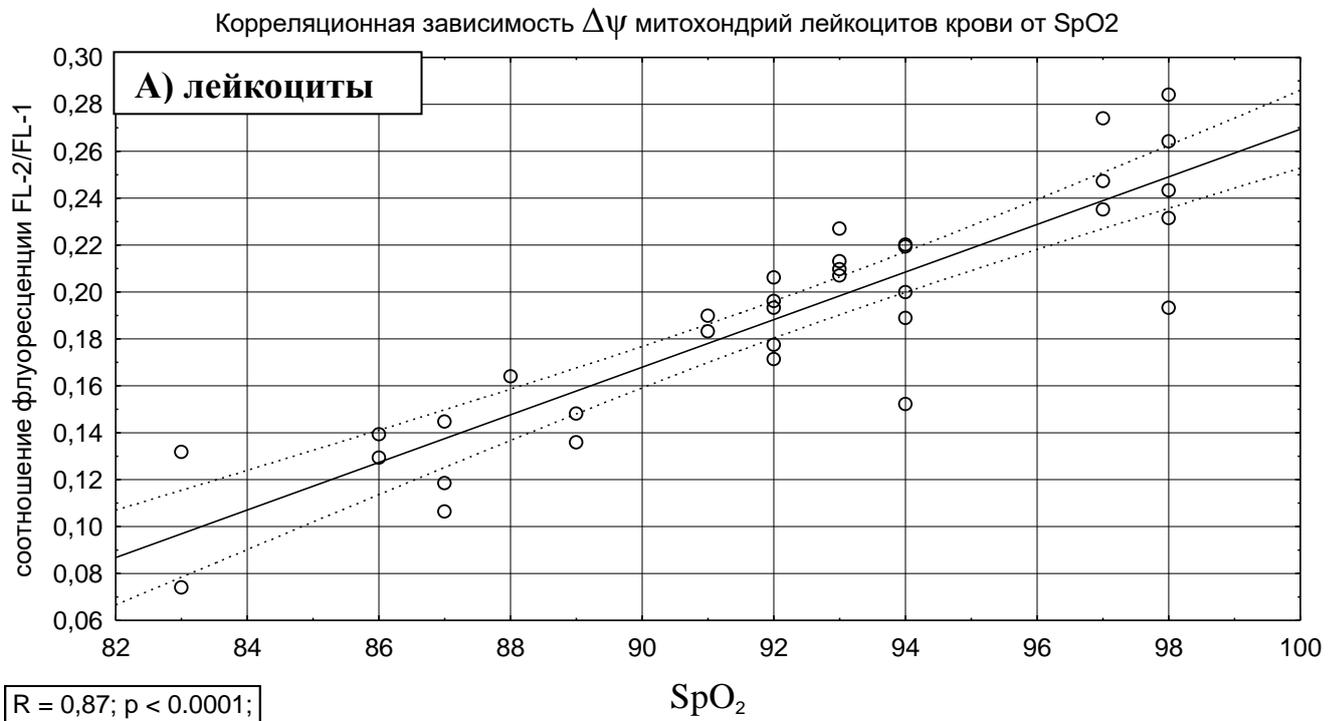


Рисунок 9 – результаты анализа корреляционной взаимосвязи между уровнем мембранного потенциала популяций моноядерных лейкоцитов (а), лимфоцитов (б), моноцитов (в) и показателем ОФВ<sub>1</sub>



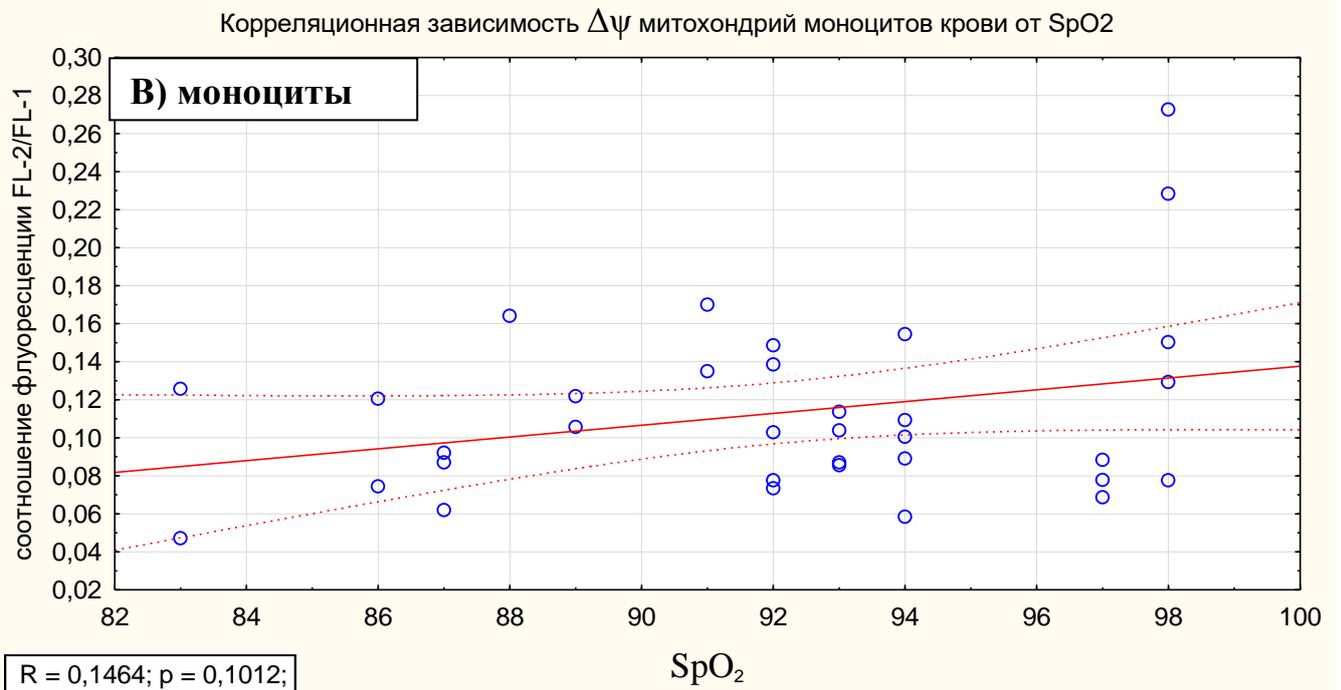
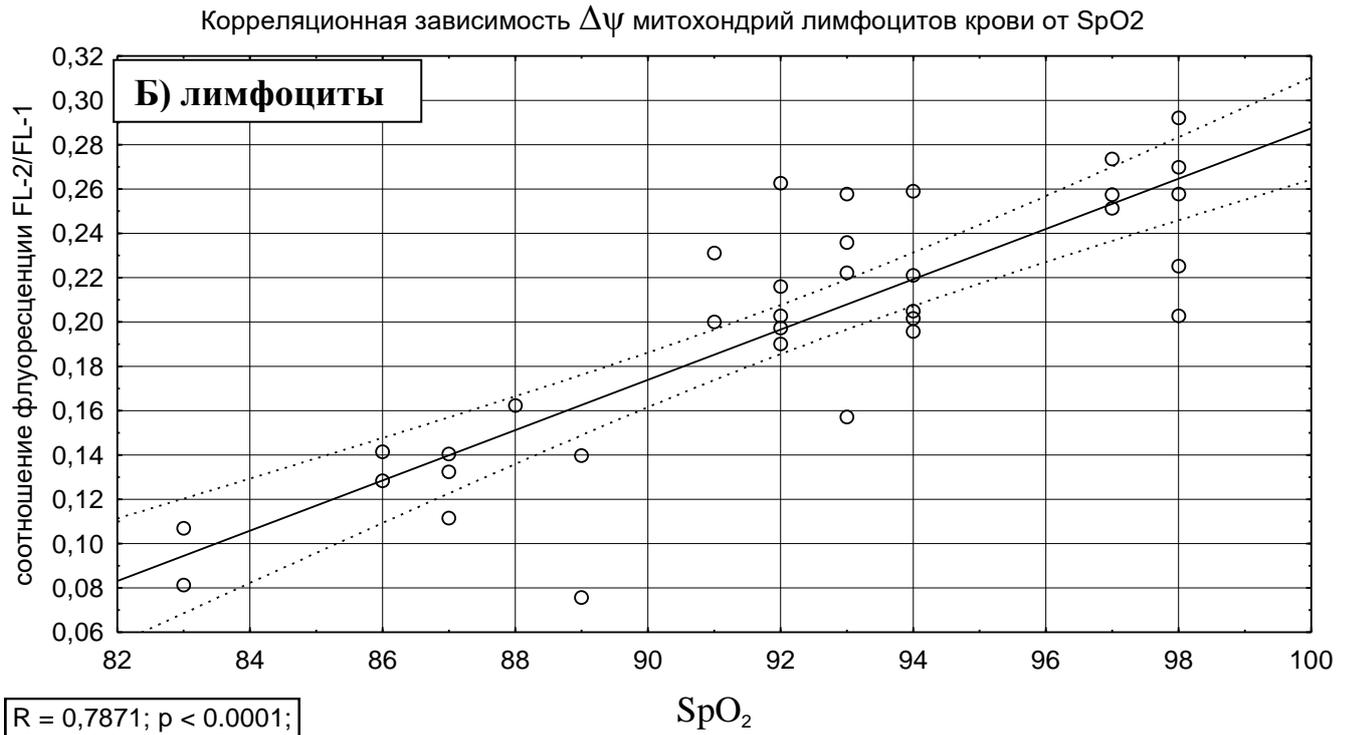


Рисунок 10 – результаты анализа корреляционной взаимосвязи между уровнем мембранного потенциала популяций моноядерных лейкоцитов (а), лимфоцитов (б), моноцитов (в) и показателем SpO<sub>2</sub>

Анализ связи показателей функций митохондрий мононуклеарных лейкоцитов и функции легких, данных пульсоксиметрии и стажа курения позволили выявить сильную положительную связь между  $SpO_2$  и активностью СОД и СДГ, что, вероятно, указывает на нарушение процессов, связанных с антиоксидантной защитой и функционированием дыхательной цепи митохондрий у больных с ХОБЛ.

Связь между  $ОФВ_1$  и показателями функционирования митохондрий носила характер также сильный положительный характер, но несколько менее выраженный по сравнению с  $SpO_2$ . Положительная сильная связь между  $ОФВ_1$  и  $SpO_2$  ( $R=0,81$ ;  $p<0,05$ ) в условиях обострения ХОБЛ демонстрирует, что, вероятно, изменение показателей функции внешнего дыхания влияет на функционирование митохондрий лейкоцитов крови опосредованно, через развитие дыхательной недостаточности обструктивного типа.

Умеренные отрицательные связи между СП ОМБ и показателями  $ОФВ_1$  и  $SpO_2$  указывают, возможно, что степень окислительного повреждения напрямую не связана 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 (таблица 16).

Были выявлены положительные сильные взаимосвязи между  $SpO_2$ ,  $ОФВ_1$  и показателями функционирования митохондрий моноядерных лейкоцитов периферической крови, такими как - мембранный потенциал митохондрий лимфоцитов, активность СОД и СДГ, концентрация сукцината. Это дает основания предполагать, что выраженность митохондриальной дисфункции мононуклеарных лейкоцитов обусловлена срывом адаптационных процессов митохондрий к гипоксемии в условиях обострения ХОБЛ, сопровождающегося нарастанием обструктивной дыхательной недостаточности.

Таблица 16 - Корреляционный анализ связей между основными объективными клинико-функциональными показателями ХОБЛ и маркерами митохондриальной дисфункции

Ранговые корреляции Спирмена R, $p < 0,05$	ОФВ <sub>1</sub> , %	SpO <sub>2</sub>	ИПЛ
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин* 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	0,74	0,78	-0,54
Концентрация сукцината, нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	0,76	0,77	-0,59
Активность СОД, УЕ/ 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	0,75	0,76	-0,52
СП ОМБ общая, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	-0,69	-0,69	0,52
РАП ОМБ, %	0,49	0,46	-0,32

Степень связи между показателями бронхообструкции и SpO<sub>2</sub> с маркерами окислительного повреждения белков носит умеренный отрицательный характер при обострении ХОБЛ. Слабая сила связи резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков и функциональных показателей ХОБЛ, вероятно, обусловлена множественными источниками оксидантов, принимающих участие в обострении ХОБЛ, что подтверждается сильной отрицательной связью СП ОМБ и  $\Delta\psi$  лимфоцитов ( $R = -0,7118$ ;  $p < 0,05$ ), близкой к сильной связи этих же показателей для лейкоцитов ( $R = -0,6913$ ,  $p < 0,05$ ), и не противоречит текущим представлениям о патогенезе заболевания [30].

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

Исследуемые группы больных В, С и D, были сопоставимы по возрасту, стажу курения, показателю ОФВ<sub>1</sub>. Больные группы D отличались статистически

значимым снижением показателя  $SpO_2$ , что отражало более выраженную гипоксемию (таблица 7).

Было выявлено, что больные группы D, характеризовавшейся наиболее выраженной гипоксемией отличались значительным снижением  $\Delta\psi$  лейкоцитов и лимфоцитов и наибольшим уровнем СП ОМБ. Данные изменения указывали на развитие митохондриальной дисфункции мононуклеарных лейкоцитов вследствие гипоксемии, что приводило к развитию окислительного стресса и могло быть определено показателем спонтанного окислительного повреждения белков. Наряду с этим больных групп С и D отличал статистически значимо сниженный уровень резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков (таблица 17).

Таблица 17 - 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
$\Delta\psi$ , лейкоциты (регион G)	0,196[0,152;0,213] $p_{1-2}=1,0$ ; $p_{1-3}=0,0164$ ;	0,193 [0,189;0,207] $p_{2-3}=0,008$ ;	0,138[0,124;0,146]
$\Delta\psi$ , лимфоциты (регион E)	0,216[0,157;0,236] $p_{1-2}=1,0$ ; $\downarrow_{1-3}$ в 1,59 раз $p_{1-3}=0,014$ ;	0,203 [0,200;0,222] $\downarrow_{2-3}$ в 1,49 раз $p_{3-4}=0,01$ ;	0,136[0,105;0,141]
$\Delta\psi$ , моноциты (регион F)	0,109[0,085;0,135]	0,089[0,078;0,149]	0,099[0,081;0,121]
СП ОМБ, у.е./ на $10^6$ клеток 1 мл суспензии	199[86;219] $p_{1-2}=1,0$ ; $\downarrow_{1-3}$ в 2,45 раз $p_{1-3}=0,005$ ;	141[91;226] $\downarrow_{2-3}$ в 3,46 раз $p_{3-4}=0,007$ ;	488[261;523]
РАП ОМБ, %	64[57;76] $\downarrow_{1-3}$ в 2,06 раз $p_{1-2}=0,018$ ; $\downarrow_{1-3}$ в 4,57 раз $p_{1-3}=0,001$ ;	31[15;45] $p_{3-4}=1,0$ ;	14[9;41]

При исследовании на большей выборке сопоставимой по  $SpO_2$  было установлено, что больные, разделенные на группы В, С и D статистически значимо отличались друг от друга по маркерам адаптации к гипоксии. При этом больные группы С, отличающиеся минимальной выраженностью симптомов, отличались наибольшей активностью СДГ и концентрацией сукцината, что, возможно, отражало напряжение механизмов быстрой адаптации митохондрий мононуклеаров к гипоксии.

Больные групп В и D, имевшие выраженный уровень симптомов, характеризовались значительным снижением активности СДГ и уменьшением концентрации сукцината в моноядерных лейкоцитах. Наиболее низкие показатели наблюдались в группе D (таблица 18).

Таблица 18 - 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; ↑ <sub>1-3</sub> в 1,43 раз p <sub>1-3</sub> =0,127;	428[357;545] ↑ <sub>2-3</sub> в 2,04 раз p <sub>2-3</sub> <0,0001;	208[157;276]

Исследование показателей окислительного стресса позволило выявить паттерн изменений, соответствующий маркерам быстрой адаптации митохондрий к гипоксии. Больные группы С имели наибольшую активность СОД и наименьший уровень спонтанных окислительно поврежденных белков моноядерных лейкоцитов относительно показателей других групп больных. В сравнении с показателями больных группы С сниженный уровень активности СДГ и

концентрации сукцината в мононуклеарах у больных ХОБЛ группы В при повышении маркеров спонтанной окислительной деструкции белков, вероятно, указывали на выраженное нарушение адаптации этих больных к гипоксемии, чему сопутствовали более выраженные клинические симптомы, оцененные с помощью опросника САТ. Наименьшая активность СДГ и концентрация сукцината мононуклеарных лейкоцитов больных группы D, вероятно, могла быть объяснена не только отсутствием активации сукцинат-зависимого механизма адаптации к гипоксии, но и непосредственным повреждением митохондрий вследствие окислительного стресса [182]. Это подтверждалось наибольшим уровнем СП ОМБ и значительным снижением активности СОД (таблица 19).

Значительное снижение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации клеток крови больных групп С и D относительно группы В, вероятно, отражало накопление окислительно измененных белков. Возможной причиной накопления ОМБ могли стать повторявшиеся обострения ХОБЛ, сопровождавшиеся гипоксемией на фоне дыхательной недостаточности, что приводило к нарушению процесса обновления окислительно поврежденных белков.

Таблица 19 - Показатели окислительного стресса мононуклеарных лейкоцитов 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 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; p <sub>1-3</sub> =0,12	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] p <sub>2-3</sub> =1,0	29[14;47]

Комплексная оценка окислительной модификации белков моноядерных лейкоцитов крови больных с обострением ХОБЛ, разделенных в зависимости от выраженности симптомов и частоты обострений, позволила установить, что показатели больных группы С характеризовались наименьшим уровнем всех типов окислительно модифицированных белков. Это указывало на важность механизма быстрой адаптации митохондрий к гипоксии, который направлен на уменьшение интенсивности окислительного стресса (таблица 20).

Таблица 20 - Комплексная оценка окислительной модификации мононуклеарных лейкоцитов крови больных ХОБЛ, разделенных в зависимости от уровня симптомов и частоты обострений

Исследуемые показатели	ХОБЛ, В n=18	ХОБЛ, С (2) n=20	ХОБЛ, D (3) n=20
СП S АДФФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	157[106;218] p <sub>1-2</sub> =0,041 p <sub>1-3</sub> =0,22	86[65;124] p <sub>2-3</sub> <0,0001	198[153;341]
СП S КДФФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	57[41;76] p <sub>1-2</sub> =0,075 p <sub>1-3</sub> =0,71	34[25;54] p <sub>2-3</sub> =0,0013	66[53;82]
СП S АДФФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	40[30;50] p <sub>1-2</sub> =0,53 p <sub>1-3</sub> =0,28	30[17;43] p <sub>2-3</sub> =0,006	50[39;62]
СП S КДФФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	6[3;8] p <sub>1-2</sub> =0,67 p <sub>1-3</sub> =0,52	4[2;7] p <sub>2-3</sub> =0,024	8[4;12]

Таким образом, 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. Больные группы С, отличавшиеся наименьшим уровнем симптомов, имели больший уровень показателей быстрого сукцинат-зависимого механизма адаптации митохондрий к

гипоксии. 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.

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

Так как основным проявлением обострения ХОБЛ является дыхательная недостаточность, связанная с гипоксемией, была выдвинута гипотеза, что предрасположенность к частым обострениям может быть проявлением процессов дезадаптации к гипоксии, которые можно определить по функционированию митохондрий моноядерных лейкоцитов.

В этой связи были исследованы показатели механизма быстрой адаптации митохондрий к гипоксии и окислительного стресса в моноядерных лейкоцитах у больных с и без фенотипа ХОБЛ с частыми обострениями (два и более обострений средней тяжести в год в анамнезе, которые потребовали обращения за медицинской помощью, включая текущую госпитализацию) [30,33].

Группа исследуемых ХОБЛ с частыми обострениями была сопоставима с группой ХОБЛ без частых обострений по уровню ОФВ<sub>1</sub>, выраженности гипоксемии и стажу курения (таблица 21).

Снижение показателей моноядерных лейкоцитов, отражающих процессы быстрой адаптации митохондрий к гипоксии, статистически значимо не отличалось у больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями и у больных без частых обострений ХОБЛ.

Таблица 21 - Клиническая характеристика сравниваемых групп больных

Исследуемые показатели	ХОБЛ с частыми обострениями и n=18 (1)	ХОБЛ без частых обострений n=40 (2)	Хронический бронхит n=24 (3)	Здоровые добровольцы n=25 (4)
ОФВ <sub>1</sub> , %	48[40;61] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	48[38;63] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	92[89;94] p <sub>3-4</sub> =1,0;	93[92;95]
SpO <sub>2</sub> , %	92[89;93] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	92[91;93] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	97[96;98] p <sub>3-4</sub> =1,0;	97[97;98]
ИПЛ, пачко-лет	25[20;30] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,08	25[20;30] p <sub>2-3</sub> =0,25	15[10;20]	0

Снижение показателей моноядерных лейкоцитов, отражающих процессы быстрой адаптации митохондрий к гипоксии, статистически значимо не отличалось у больных с фенотипом ХОБЛ с частыми обострениями и у больных без частых обострений ХОБЛ.

Данный характер изменений можно объяснить гетерогенностью группы больных с частыми обострениями, которая включала как больных группы С, так и больных группы D, в свою очередь, значительно отличавшихся показателями сукцинат-опосредованного механизма адаптации митохондрий к гипоксии в моноядерных лейкоцитах (таблица 22).

Исследование степени выраженности окислительного стресса при сравнении группы больных с фенотипом хроническая обструктивная болезнь легких с частыми обострениями и группы больных без частых обострений выявило

статистически значимое уменьшение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков.

Таблица 22 - Изменение активности СДГ и концентрации сукцината в моноядерных лейкоцитах исследуемых групп

Исследуемые показатели	ХОБЛ с частыми обострениям n=18 (1)	ХОБЛ без частых обострений n=40 (2)	Хронический бронхит n=24 (3)	Здоровые добровольцы n=25 (4)
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин* 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	38[15;64] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	34[31;38] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	102[82;125] p <sub>3-4</sub> =1,0	93[87;98]
Концентрация сукцината, нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	325[208;435] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	299[216;365] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	739[664;863] p <sub>3-4</sub> =1,0	743[689;786]

Исследование степени выраженности окислительного стресса при сравнении группы больных с фенотипом хроническая обструктивная болезнь легких с частыми обострениями и группы больных без частых обострений выявило статистически значимое уменьшение резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков.

Полученные результаты, вероятно, отражали истощение механизмов обновления белков при частых повторных окислительных стрессах, сопровождавших обострения ХОБЛ (таблица 23).

Таблица 23 - Показатели окислительного стресса 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)
Активность СОД, УЕ/ 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	31[10;45] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	27[21;34] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> =0,0001	80[74;85] p <sub>3-4</sub> =1,0	72[64;82]
СП ОМБ общая, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	248[148;332] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	237[211;361] p <sub>2-3</sub> =0,0002 p <sub>2-4</sub> =0,0001	48[37;78] p <sub>3-4</sub> =1,0	50[34;91]
РАП ОМБ, %	27[15;47] p <sub>1-2</sub> <0,0001 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> =0,0002	68[64;80] p <sub>2-3</sub> =1,0 p <sub>2-4</sub> =1,0	76[65;87] p <sub>3-4</sub> =1,0	77[66;85]

Качественный анализ окислительной модификации белков не выявил статистически значимых отличий между группой больных с фенотипом хронической обструктивной болезни легких с частыми обострениями и группой без фенотипа хроническая обструктивная болезнь легких с частыми обострениями.

Таблица 24 - Показатели комплексной оценки окислительной модификации белков исследуемых групп

Исследуемые показатели	ХОБЛ с частыми обострениями и n=40 (1)	ХОБЛ без частых обострений n=18 (2)	Хронический бронхит n=24 (3)	Здоровые добровольцы n=25 (4)
СП S АДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	142[85;211] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> =0,0002 p <sub>1-4</sub> =0,0001	157[106;218] p <sub>2-3</sub> =0,0002 p <sub>2-4</sub> <0,0001	27[17;43] p <sub>2-3</sub> =1,0	20[14;49]
СП S КДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	54[33;70] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> =0,0001	57[41;76] p <sub>2-3</sub> =0,0002 p <sub>2-4</sub> =0,0004	12[9;18] p <sub>2-3</sub> =1,0	17[10;24]
СП S АДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	41[21;53] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	40[30;50] p <sub>2-3</sub> =0,0007 p <sub>2-4</sub> =0,0002	7[3;10] p <sub>2-3</sub> =1,0	6[3;11]
СП S КДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	6[2,4;9,3] p <sub>1-2</sub> =1,0 p <sub>1-3</sub> <0,0001 p <sub>1-4</sub> <0,0001	5,6[3,3;7,9] p <sub>2-3</sub> <0,0001 p <sub>2-4</sub> <0,0001	0,78[0,2;1,8] p <sub>2-3</sub> =1,0	0,5[0,2;0,8]

В обеих группах больных с ХОБЛ наблюдался значительный прирост всех показателей окислительной деструкции белков по сравнению как с показателями группы больных хроническим бронхитом, так и по сравнению с показателями группы здоровых добровольцев (таблица 24).

Таким образом, больных ХОБЛ с частыми обострениями отличает, в первую очередь, снижение уровня резервно-адаптационного потенциала окислительной модификации белков, что может быть объяснено непосредственным частым повторением эпизодов окислительного стресса. Важно отметить, что больные с частыми обострениями также представляют собой гетерогенную группу больных и

определение показателей быстрых механизмов адаптации митохондрий к гипоксии может быть рассмотрено как дополнительный критерий оценки тяжести таких больных.

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

Было выявлено, что уровень  $\Delta\psi$  лейкоцитов и лимфоцитов курящих больных с ХОБЛ в сравнении с показателями контрольной группы значительно снижен, в то время как показатели  $\Delta\psi$  группы экс-курильщиков были снижены в меньшей степени по сравнению с контролем. При этом  $\Delta\psi$  в популяции моноцитов статистически значимо не различался. Показатели окислительной деструкции белков были статистически значимо повышены относительно контроля как в группе курильщиков с ХОБЛ, так и экс-курильщиков с ХОБЛ. Показатели окислительной модификации групп больных с ХОБЛ, разделенных по отношению к курению между собой, статистически значимо не отличались (таблица 25).

Исследование  $\Delta\psi$  в зависимости от статуса курения позволило установить, что в развитие митохондриальной дисфункции лимфоцитов при обострении ХОБЛ хроническое воздействие сигаретного дыма вносит значимый вклад. При этом отказ от курения ассоциировался со статистически значимым меньшим снижением  $\Delta\psi$  мононуклеарных лейкоцитов крови и меньшим уровнем окислительной модификации белков мононуклеарных лейкоцитов. Отказ от курения способствует уменьшению выраженности митохондриальной дисфункции и связанному с ней окислительному стрессу.

Для изучения механизмов быстрой адаптации к гипоксии и показателей оксидативного стресса больные с ХОБЛ были разделены на группы сопоставимые по уровню бронхобструкции,  $SpO_2$  и индексу пачко-лет (таблица 26).

Таблица 25 - Сравнение показателей мембранного потенциала митохондрий мононуклеаров крови у курильщиков и экс-курильщиков с обострением ХОБЛ

Показатели	Группы		
	Контроль, n=8 (группа 1)	ХОБЛ курящие, n=13 (группа 2)	ХОБЛ экс- курильщики, n=13 (группа 3)
Δψ, лейкоциты (регион G)	0,24±0,028	0,146±0,037 ↓ <sub>1-2</sub> на 39,2% p <sub>1-2</sub> =0,000125	0,20±0,0284 ↓ <sub>1-3</sub> на 16% P <sub>1-3</sub> = 0,000743 ↑ <sub>2-3</sub> на 37% P <sub>2-3</sub> =0,000674
Δψ, лимфоциты (регион E)	0,254±0,028	0,146±0,048 ↓ <sub>1-2</sub> на 42,5% p <sub>1-2</sub> =0,000126	0,218±0,0357 ↓ <sub>1-3</sub> на 14,2% P <sub>1-3</sub> =0,026246 ↑ <sub>2-3</sub> на 49% P <sub>2-3</sub> =0,000559
Δψ, моноциты (регион F)	0,11[0,08;0,19]	0,103[0,086;0,122]	0,104[0,087;0,1386]
СП ОМБ, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	24 [15;49]	236 [219;495] ↑ <sub>1-2</sub> в 9,7 раз p <sub>1-2</sub> =0,000254 ↑ <sub>2-3</sub> в 1,45 раз p <sub>1-3</sub> =0,0249	162 [91;216] ↑ <sub>1-3</sub> в 6,75 раз p <sub>1-3</sub> =0,033
РАП ОМБ, %	79,3±11,5	44,4±27,5 ↓ <sub>1-2</sub> на 44% p <sub>1-2</sub> =0,0015	42,3±23,1 ↓ <sub>1-2</sub> на 46,6% p <sub>1-3</sub> =0,0023

Таблица 26 - Клиническая характеристика исследуемых групп

Исследуемые показатели	ХОБЛ курильщик n=34	ХОБЛ экскурильщик n=24
ОФВ <sub>1</sub> , %	45[35;61]	51[43;62]
SpO <sub>2</sub> , %	92[89;93]	92[91;94]
ИПЛ, пачко-лет	25[20;30]	25[15;30]

Сравнивая активность СДГ в группах больных с ХОБЛ, было установлено её снижение в 1,4 раз у курящих больных с обострением. Данное изменение демонстрировало положительное влияние отказа от курения на активацию

механизмов быстрой адаптации к гипоксии у больных ХОБЛ с обострением (таблица 27).

Таблица 27 - Показатели активности СДГ и концентрации сукцината в моноядерных лейкоцитах курильщиков и экс-курильщиков с обострением ХОБЛ

Исследуемые показатели	ХОБЛ курильщик n=34	ХОБЛ экс- курильщик n=24
Активность СДГ, нмоль сукцината/мин* 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	28[15;53] p=0,028	39[30;68]
Концентрация сукцината, нмоль на / 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	304[211;372]	334[240;412]

Исследование показателей окислительного стресса выявило больший уровень активности СОД (в 1,7 раз) у экс-курильщиков с ХОБЛ. При этом остальные исследуемые показатели были сопоставимы (таблица 28). Данное изменение демонстрировало непосредственное негативное влияние курения на антиоксидантную защиту у больных с ХОБЛ типичное для различных тканей [102,150].

Таблица 28 - Показатели окислительного стресса у курильщиков и экс-курильщиков при обострении ХОБЛ

Исследуемые показатели	ХОБЛ курильщик n=34	ХОБЛ экскурильщик n=24
Активность СОД, УЕ/ 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	21[8;38] p=0,003	36[21;53]
СП ОМБ общая, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	237[157;333]	247[181;321]
РАП ОМБ, %	42[20;59]	46[16;66]

Отсутствие статистически значимых отличий маркеров окислительной модификации белков между группами курильщиков и экс-курильщиков с ХОБЛ указывает на незначительное влияние курение на характер окислительной модификации белков при обострении ХОБЛ (таблица 29).

Таблица 29 - Сравнение показателей комплексной оценки окислительной модификации белков у курильщиков и экс-курильщиков с обострением ХОБЛ

Исследуемые показатели	ХОБЛ курильщик n=34	ХОБЛ экскурильщик n=24
СП S АДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	152[88;218]	137[78;211]
СП S КДНФГ uv, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	53[30;66]	54[38;51]
СП S АДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	38[22;51]	43[32;51]
СП S КДНФГ vs, у.е./ на 10 <sup>6</sup> клеток 1 мл суспензии	6[3;8]	6[3;10]

Таким образом, отказ от курения связан с более высоким уровнем активности СДГ и концентрацией сукцината мононуклеарных лейкоцитов, что способствует реализации механизму быстрой адаптации митохондрий к гипоксии при обострении у больных с ХОБЛ. Меньший уровень МПМ мононуклеаров у экс-курильщиков с ХОБЛ по сравнению с группой здоровых добровольцев демонстрирует, что вторичная митохондриальная дисфункция сохраняется в отсутствии воздействия причинного фактора. 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.

#### ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 [47,71].

Исследования, посвященные механизмам окислительного стресса, вносят вклад в понимание характера хронического воспаления при ХОБЛ и резистентности к противовоспалительному действию ингаляционных глюкокортикостероидов, что в значительной степени изменяет подходы к ведению больных [63].

Выявленные тесные взаимосвязи митохондриальной дисфункции и окислительного стресса в экспериментальных работах в моделях на животных и клеточных культурах клеток тканей человека указывают на перспективность исследования роли митохондриальной дисфункции в развитии ХОБЛ. Например, экспериментально продемонстрирован терапевтический потенциал митохондриально-ориентированных антиоксидантов, связанный, в том числе, с уменьшением гиперреактивности бронхов и уменьшением активности фибробластов, которые являются важной частью патогенеза ХОБЛ. [171].

По мнению ряда исследователей выраженность митохондриальной дисфункции клеток периферической крови можно рассматривать как возможный предиктор адаптивных реакций всего организма [42,158]. В связи с этим представляется актуальным исследование клинического значения маркеров системной вторичной митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови у больных с обострением ХОБЛ.

Данное исследование проводилось с целью охарактеризовать вторичную митохондриальную дисфункцию моноядерных лейкоцитов крови и оценить её взаимосвязь с основными клинико-функциональными показателями больных с обострением хронической обструктивной болезни легких.

В работе обобщены результаты исследования, проведенного с 2017 по 2018 годы, в которое были включены 3 группы исследуемых: 1-я группа - 58 пациентов с хронической обструктивной болезнью легких, госпитализированные для стационарного лечения в пульмонологическое отделение ГБУ РО «Областная клиническая больница» г. Рязань по поводу обострения, 2-я группа – 24 больных с обострением хронического бронхита в ГБУ «Поликлиника №6» г. Рязань, 3-я группа – 25 здоровых добровольцев.

В соответствии с поставленными задачами методы исследования включали общеклиническое обследование, общеклинический анализ крови для исключения моноцитоза, спирометрию, биохимические исследования показателей моноядерных лейкоцитов крови: уровня окислительной модификации белков, активности супероксиддисмутазы и сукцинатдегидрогеназы, концентрации сукцината.

В выборке из 34 человек, включавшей 26 больных с обострением ХОБЛ и 8 здоровых добровольцев, проведено исследование уровня мембранного потенциала митохондрий в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови методом проточной цитофлуометрии.

Все исследуемые группы были сопоставимы по возрасту. Группа больных с обострением хронического бронхита (мужчин 54% и 46% женщин) и группа здоровых добровольцев были сопоставимы по полу (52% мужчин и 48% женщин), в то время как в группе ХОБЛ в половом составе преобладали мужчины (83% мужчин и 17% женщин), что соответствует эпидемиологии данного заболевания в отечественных исследованиях [7].

В группе больных ХОБЛ активными курильщиками являлись 58,6%, экс-курильщиками – 41,4%, в группе больных с хроническим бронхитом – 100% активные курильщики. При этом показатель индекса пачко-лет был статистически значимо больше у больных с ХОБЛ по сравнению с больными хроническим бронхитом. Группа здоровых добровольцев не включала курильщиков. Экс-курильщики как с ХОБЛ, так и с хроническим бронхитом имели в анамнезе срок отказа от курения минимум 1 год.

Проведение проточной цитофлуориметрии с использованием катионного красителя JC-1 выявило статистически значимое снижение уровня мембранного потенциала моноядерных лейкоцитов в группе больных с обострением ХОБЛ по сравнению со здоровыми добровольцами. Снижение мембранного потенциала - один из наиболее достоверных признаков нарушения функционирования митохондрий, поэтому полученные результаты подтверждали развитие вторичной митохондриальной дисфункции при обострении ХОБЛ не только в тканях легких и мышц, что в настоящее время хорошо установлено, но и в моноядерных лейкоцитах крови. Это позволило предположить системный характер нарушения функционирования митохондрий при обострении ХОБЛ [138,149,185].

Необходимо отметить, что достоверные изменения мембранного потенциала были зафиксированы как общей популяции моноядерных лейкоцитов, так и в популяции лимфоцитов, в то время как изменения в популяции моноцитов носили статистически незначимый характер. Вероятно, это обусловлено большей чувствительностью лимфоцитов крови к нарушению процессов митохондриального дыхания в условиях гипоксемии, связанной с дыхательной недостаточностью при ХОБЛ, что может создавать предпосылки для нарушения их нормального функционирования. Данные результаты продемонстрировали перспективность оценки мембранного потенциала митохондрий лимфоцитов крови как возможного маркера системной вторичной митохондриальной дисфункции, что, в свою очередь, может быть использовано для выделения эндотипа больных ХОБЛ, которые будут способны получить наибольшую выгоду от митохондриально-ориентированной терапии.

Исследование маркеров окислительного стресса в большей выборке подтвердило взаимосвязь между развитием митохондриальной дисфункции и окислительным стрессом, что отразилось в значительном снижении РАП ОМБ и многократном увеличении уровня СП ОМБ больных ХОБЛ как по сравнению с группой с обострением хроническим бронхитом, так и по сравнению с группой здоровых добровольцев, что не противоречит исследованиям других авторов [108,148,171,173,182,233].

Роль сукцината в качестве сигнальной молекулы, участвующей в процессах адаптации к гипоксии клеток нервной системы, изучена достаточно хорошо, в то время как значение сукцинат-опосредованных механизмов адаптации митохондрий клеток других тканей остается до настоящего времени не полностью изученным. Обнаружение маркеров адаптации к гипоксемии среди малосимптомных больных с обострением ХОБЛ могло бы быть полезным в клинической практике для объективизации тяжести состояния. Потребность в дополнительных критериях в оценке состояния больных с ХОБЛ обусловлена тем, что часть больных с ХОБЛ, вследствие адаптации к дыхательной недостаточности и связанной с ней гипоксемией, характеризуется несоответствием тяжести обструктивных нарушений выраженности симптомов заболевания [4]. В рамках данной работы была проведена оценка активности СДГ и концентрации внутриклеточного сукцината как маркеров быстрой адаптации митохондрий мононуклеарных лейкоцитов крови при ХОБЛ. Было выявлено значительное снижение концентрации сукцината и активности СДГ, что, вероятно, демонстрировало срыв адаптационных процессов при обострении ХОБЛ и вносило вклад в развитие системной митохондриальной дисфункции при обострении ХОБЛ. На неэффективность адаптационных процессов указывал так же низкий уровень активности СОД моноядерных лейкоцитов больных с ХОБЛ, что согласуется с представлениями о нарушении механизмов антиоксидантной защиты у больных с ХОБЛ [102].

Сравнение исследуемых клинико-функциональных и биохимических показателей в группах больных ХОБЛ с гипертонической болезнью и ХОБЛ без гипертонической болезни не выявило статистически значимых различий, что позволяло сделать предположение об отсутствии значимого влияния гипертонической болезни 2 стадии как сопутствующего заболевания на показатели вторичной митохондриальной дисфункции моноядерных лейкоцитов крови при обострении хронической обструктивной болезни легких.

В условиях обострения хронической обструктивной болезни легких тяжесть бронхообструктивных нарушений в значительной мере связана со степенью

дыхательной недостаточности, проявляющейся снижением насыщения крови кислородом, необходимым для функционирования митохондриальной дыхательной цепи переноса электронов. Поэтому для определения роли бронхообструктивных нарушений в развитии системной вторичной системной митохондриальной дисфункции в патогенезе обострения ХОБЛ, показатели моноядерных лейкоцитов были исследованы в группах больных ХОБЛ разделенных в зависимости от показателя  $ОФВ_1$ . Сравнимые группы были сопоставимы по возрасту, индексу пачко-лет, сопутствующей патологии и структуре терапии. Доля женщин в группе ХОБЛ 2 была выше (30%) по сравнению с группой ХОБЛ 3 (6%). При этом большей степени обструктивных нарушений (62[58;68] % ХОБЛ 2, 40[35;43] % ХОБЛ 3), соответствовали более низкие показатели  $SpO_2$  (93[91;93]% ХОБЛ 2, 91[88;92]% ХОБЛ 3).

Исследование мембранного потенциала митохондрий методом проточной цитометрии позволило выявить, что снижение уровня мембранного потенциала моноядерных лейкоцитов, преимущественно лимфоцитов, в наибольшей степени коррелирует с уровнем  $SpO_2$ , отражающим выраженность дыхательной недостаточности у больных с обострением ХОБЛ, а не с  $ОФВ_1$ , характеризующим выраженность обструкции бронхов. Полученные результаты соответствовали представлениям об ограниченной роли  $ОФВ_1$  в оценке тяжести ХОБЛ [4,230].

Исследование на большей выборке взаимосвязей между  $SpO_2$  и маркерами митохондриальной дисфункции выявило сильную положительную связь между показателями механизма быстрой адаптации к гипоксии (активность СДГ и концентрация общего внутриклеточного сукцината) и умеренной силы отрицательную связь с уровнем спонтанной окислительной модификацией белков. Таким образом, была продемонстрирована важность механизмов адаптации к гипоксии у больных с ХОБЛ, которая, вероятно, вносит вклад в гетерогенность клинических проявлений заболевания.

Стоит отметить, что показатель РАП ОМБ умеренно положительно коррелировал как с выраженностью гипоксемии, определяемой с помощью пульсоксиметрии, так и с показателем  $ОФВ_1$ . Это позволило предположить, что

данный показатель оксидативного повреждения не зависел только лишь от выраженности гипоксемии при данном обострении заболевания.

Необходимо отметить, что многими исследователями подчеркивается клиническая неоднородность больных с ХОБЛ [47,86,230]. При этом отмечается роль адаптации к дыхательной недостаточности, когда больные ХОБЛ с тяжелой степенью бронхообструкции предъявляют меньше жалоб на одышку. В свою очередь, это приводит к ослаблению наблюдаемой связи между показателями бронхообструкции и выраженностью симптомов [4,165].

Было выдвинуто предположение, что механизмы адаптации к дыхательной недостаточности обязательно будут затрагивать митохондриальное звено, что возможно зафиксировать в лейкоцитах крови вследствие системного характера гипоксии. С этой целью сравнивались исследуемые показатели в группах, полученных с помощью комбинированной оценки ХОБЛ.

Исследование мембранного потенциала моноядерных лейкоцитов у больных с обострением ХОБЛ позволило выявить наибольшую выраженность митохондриальной дисфункции, определяемой по снижению  $\Delta\psi$  у больных группы риска D. При этом показатели групп риска B и C были сопоставимы. Данные результаты указывали на важность такого клинического аспекта в оценке тяжести ХОБЛ как история частоты обострений заболевания при очевидной меньшей значимости жалоб, которые по результатам опросников были сопоставимы в группах B и D.

На себя обращало внимание снижение показателя РАП ОМБ у больных группы C и D, наиболее выраженное в группе D. Необходимо отметить, что в данной выборке в группе D наблюдалась статистически значимо более выраженная гипоксемия (87[86;89]%), по сравнению с группами B (92[91;93]%) и C (93[92;94%]).

При исследовании на выборке большего объема, в группах сопоставимых по показателю  $SpO_2$ , были выявлены значимые различия в группах как по показателям механизма быстрой адаптации митохондрий к гипоксии, так и по маркерам окислительного стресса.

Из полученных результатов следовало, что клиническая гетерогенность больных ХОБЛ ассоциирована с различной степенью снижения показателей СДГ и концентрации внутриклеточного сукцината в моноядерных лейкоцитах крови. Так наименьшее снижение маркеров механизма быстрой адаптации митохондрий к гипоксии наблюдалось в группе С, характеризовавшейся частыми обострениями заболевания и небольшим количеством жалоб. При этом в группе С наблюдался также наименьший уровень СП ОМБ. У больных групп В и D уровень сукцината и СДГ был ниже по сравнению с группой С. При этом в группе D показатели имели наименьший уровень. Данная особенность в сочетании с наибольшим уровнем СП ОМБ у больных с ХОБЛ группы D, а так же тесной положительной корреляционной связью между  $SpO_2$  и показателями активности СДГ и концентрацией сукцината моноядерных лейкоцитов, отражало, возможно, вклад механизма адаптации митохондрий к острой гипоксии на системном уровне в формирование такого клинического аспекта ХОБЛ, как жалобы, связанные с одышкой. Исследование РАП ОМБ на большей выборке - в группах, выделенных по частоте обострений и выраженности симптомов, сопоставимых по уровню  $SpO_2$ , продемонстрировало статистически значимое снижение показателя в группах С и D по сравнению с группой В. Таким образом, было продемонстрировано, что характер повреждения клеток вследствие системного окислительного стресса при ХОБЛ связан не только с выраженностью дыхательной недостаточности, но и с историей обострения заболевания.

Фенотип больных ХОБЛ с частыми обострениями наиболее неблагоприятен в прогностическом аспекте, так как связан с повышенной смертностью, ускоренным нарушением функции легких и значительным снижением качества жизни. Установлено, что частые госпитализации таких больных не приводят к полному восстановлению функции легких после обострения, что ведет в итоге к кумуляции легочных и системных нарушений [2], несмотря на значительные затраты, связанные с максимизацией объема проводимой фармакотерапии и реабилитацией. Вместе с тем, наиболее чувствительным предиктором на настоящее время является частота обострений в анамнезе [80]. Поэтому большой интерес представляет поиск

маркеров, которые могли бы указывать на повышенный риск обострений еще до развития повторных обострений.

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. 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. Данная особенность может быть объяснена непосредственным частым повторением эпизодов окислительного стресса и срывом компенсаторных механизмов обновления белков. 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. Таким образом, обнаруживается связь между разделением больных на группы в зависимости от частоты обострений и выраженности симптомов и показателями быстрой адаптации митохондрий к гипоксии, что демонстрирует потенциальную пользу оценки показателей активности СДГ и/или концентрации сукцината моноядерных лейкоцитов крови в стратификации тяжести больных с ХОБЛ.

Курение является важнейшим этиопатогенетическим фактором ХОБЛ, который приводит к развитию воспаления в стенках бронхов и паренхиме легких, в том числе индуцируя окислительный стресс напрямую и опосредованно через индукцию вторичной митохондриальную дисфункцию [150]. Отказ от курения является одной из важнейших мер необходимых для предупреждения прогрессирования ХОБЛ. Вместе с тем накапливаются данные о том, что даже после отказа от курения митохондриальная дисфункция и обусловленный ею воспалительный процесс в легких больных ХОБЛ сохраняется [182]. Ввиду этого

представляет собой интерес исследование влияния отказа от курения у больных с обострением ХОБЛ на изменение функционирование митохондрий.

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. Однако, 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. При этом снижение РАП ОМБ мононуклеарных лейкоцитов было сопоставимо у курящих и некурящих пациентов с ХОБЛ по сравнению с контрольной группой.

Изучение более крупной выборки позволило выявить положительное влияние отказа от курения на уровень активностей СДГ (+39%) и СОД (+71%) моноядерных лейкоцитов крови. При этом показатели окислительного стресса и концентрации сукцината были сопоставимы в сравниваемых группах.

Полученные результаты указывают, что курение вносит значимый вклад в развитие системной митохондриальной дисфункции у больных с ХОБЛ и отказ от курения ассоциирован с положительной динамикой изменения показателей функционирования митохондрий. Вместе с тем, как следует из полученных данных, у экс-курильщиков при обострении сохраняется вторичная системная митохондриальная дисфункция, которая, по данным исследователей, способна персистировать и вносить вклад в изменение характера воспаления в различных тканях, в итоге обуславливая клинические изменения, связанные с легочными и внелегочными изменениями при ХОБЛ [62,63]. 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 СОКРАЩЕНИЙ**

2,4-ДНФГ – 2,4- динитрофенилгидразин

S АДНФГ – площадь под кривой спектра поглощения альдегид-динитрофенилгидразонов

S КДНФГ - площадь под кривой спектра поглощения кетон-динитрофенилгидразонов

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

АОС – антиоксидантная система

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

БА – бронхиальная астма

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ДДБД – длительной действующие бета2-агонисты

ДДХЛ – длительно действующие холинолитики

ЖЕЛ – жизненная емкость легких

ИГКС – ингаляционные глюкокортикостероиды

ИЛ-6 -интерлейкин 6

ИЛ-8 – интерлейкин 8

МК ОМБ -металл-катализируемая окислительная модификация белков

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

мТАФК -митохондриальные активные формы кислорода

мтДНК – митохондриальные ДНК

ОС -окислительный стресс

ОФВ1 – объем форсированного выдоха за 1 секунду

РАП ОМБ – резервно-адаптационный потенциал окислительной модификации белков

СДГ - сукцинатдегидрогеназа

СОД - супероксиддисмутаза

СП ОМБ – спонтанная окислительная модификация белков  
С-РБ – С-реактивный белок  
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания  
ТФР-бета – трансформирующий фактор роста бета  
ФДЭ-4 - фосфодиэстераза 4-го типа  
ФЖЕЛ – форсированная жизненная емкость легких  
ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких  
ЦПЭ -цепь переноса электронов  
САТ – COPD assessment test, тест оценки ХОБЛ  
DAMPs – damage associated molecular patterns, молекулярные паттерны ассоциированные с повреждением  
DRP1 – динамин-1 подобный белок  
ЕРК - extracellular signal-regulated kinase, регулируемая внеклеточными сигналами киназа  
Ext – экстинкция, оптическая плотность  
FADH<sub>2</sub> -флавинадениндинуклеотид восстановленный  
GOLD – Global initiative for chronic obstructive lung disease, Глобальная инициатива по хронической обструктивной болезни легких  
Hb - гемоглобин  
HDAC2 – деацетилаза гистонов 2  
MAVS – митохондриальный противовирусный сигнальный белок  
mMRC - modified Medical Research Council, шкала выраженности одышки  
mtNOS – митохондриальная синтаза оксида азота (II)  
NAD - никотинамидадениндинуклеотид  
NADH\*H – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный  
NO (II) – оксид азота (II)  
PGC-1 $\alpha$  – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом, гамма-коактиватор 1 альфа

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Абросимов, В.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких и пневмосклероз – еще один фенотип / В.Н. Абросимов. - Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2012. - №4.- С.95–99. DOI: 10.18093/0869-0189-2012-0-4-95-99
2. Айсанов, З.Р. Фенотип хронической обструктивной болезни легких с частыми обострениями и современная противовоспалительная терапия / З.Р. Айсанов, Е.Н. Калманова, О.Ю. Стулова. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2013. -№1. - С. 68-76. DOI: 0.18093/0869-0189-2013-0-1-68-76
3. Арутюнян, А.В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: методические рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – С. 90-92. - Текст : непосредственный
4. Барабанова, Е.Н. GOLD (2017): что и почему изменилось в глобальной стратегии лечения хронической обструктивной болезни легких? / Е.Н. Барабанова. - Текст : непосредственный // Пульмонология. - 2017. - Т. 27, № 2. - С.274–282.
5. Бельских, Э.С. Современные представления о патогенезе и подходах к коррекции митохондриальной дисфункции / Э.С. Бельских, В.И., Звягина, О.М. Урясьев. - Текст : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2016. - №1. - С. 203-210.
6. Ведение больных хобл: роль оценки заболевания в реальной клинической практике (обзор литературы) / А.А. Низов, А.Н. Ермачкова, В.Н. Абросимов, И.Б. Пономарева. - Текст : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2018. -Т.6, №3. - С. 429-438.
7. Эпидемиологические особенности хронических респираторных заболеваний в разных климатогеографических регионах России / М.Г. Гамбарян, А.М. Калинина, С.А. Шальнова., А.Д. Деев. - Текст : непосредственный // Пульмонология. - 2014. - №3. - С.-55–61. DOI: 10.18093/0869-0189-2014-0-3-55-61
8. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1988. – 459 с. - Текст : непосредственный.

9. ГОСТ Р ИСО 5479-2002 «Статистические методы. Проверка отклонения распределения вероятностей от нормального распределения» от 01.07.2002. Медико-биологическая статистика. – М.,2002. - Текст : непосредственный.
10. Диагностическое значение биомаркеров системного воспаления при хронической обструктивной болезни легких / А.В. Будневский, Е.С. Овсянников, А.В. Чернов, Е.С. Дробышева. - Текст : непосредственный // Клиническая медицина. - 2014. - Т. 92, № 9. - С. 16-21.
11. Дубинина, Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клиничко-биохимические аспекты / Е.Е. Дубинина. - СПб.: Медицинская пресса, 2006. - 400 с. - Текст : непосредственный.
12. 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. DOI: 10.23888/HMJ201862203-210.
13. К вопросу о митохондриальной дисфункции при хронической обструктивной болезни легких / Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, Т.И. Виткина [и др.]. - Текст : непосредственный // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2016. - Т. 1, № 60. - С. 28–33.
14. Клиническая эффективность рофлумаиласта и легочной реабилитации у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и сахарным диабетом 2-го типа / А.В. Будневский, Е.С. Овсянников, А.В. Перцев, Н.В. Полякова. - Текст : непосредственный // Практическая пульмонология.- 2017.- № 2.- С. 29-36.
15. Клинические рекомендации диагностика и лечение артериальной гипертонии. - Текст : непосредственный // Кардиологический вестник. – 2015. - Т. 10, №1. – С. 3-30.
16. Комплексная оценка степени тяжести ХОБЛ на амбулаторно-поликлиническом приеме / А.А. Низов, А.Н. Ермачкова, В.Н. Абросимов, И.Б. Пономарева. - Текст : непосредственный // Российский медико-биологический

вестник имени академика И.П. Павлова. – 2019. – Т.27,№1. – С. 50-65.  
DOI:10.23888/PAVLOVJ201927159-65

17. Кытикова, О.Ю. Влияние хронической обструктивной болезни легких на качество жизни больных разных возрастных групп / О.Ю. Кытикова, Т.А. Гвозденко. - Текст : непосредственный // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. - 2015. - № 55. - С.35-38.

18. Ли, Л. А. Оценка дисфункции митохондрий при внебольничной пневмонии у детей / Л. А. Ли, О.А. Лебедько, В. К. Козлов. - Текст : непосредственный // Дальневосточный медицинский журнал. – 2015. - № 2. - С. 30-36.

19. Мембранный потенциал митохондрий тромбоцитов у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких / Е.Г. Лобанова, Е.В. Кондратьева, Е.Е. Минеева, Ю.К. Краман. - Текст : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. - Т. 59, № 6. - С. 13-16.

20. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 327с. - Текст : непосредственный .

21. Научно-исследовательский проект Фонда «Качество жизни»: «Социально-экономические потери от бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких в Российской Федерации». - Текст : непосредственный // Научно-исследовательский проект Фонда «Качество жизни». - 2013.- URL: <http://www.qualityoflife.ru/programms/issledovanie-%C2%ABsotsialno-ekonomicheskie-poteri-ot-bronhialnoj-astmy-i-hronicheskoy-obstrukt>

22. Низов, А.А. Оценка распространенности факторов риска и изучение структуры хронических обструктивных заболеваний легких среди населения городского терапевтического участка / А.А. Низов, А.Н. Вьюнова. - Текст : непосредственный // Российский научный журнал. – 2015. – №1 (44). – С. 324-329.

23. Новые возможности в профилактике обострений хронической обструктивной болезни легких. Заключение группы специалистов российского респираторного общества / С.Н. Авдеев, З.Р. Айсанов, А.С. Белевский [и др.]. - Текст : непосредственный // Пульмонология. - 2017. - Т. 27, № 1. - С. 108-113.

24. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод её определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И.Г. Поротов. - Текст : непосредственный // Вопр. мед. химии. - 1995. - Т.41, № 1. – С.24-26.
25. Оценка качества жизни у больных хронической обструктивной болезнью легких в сочетании с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.А. Низов, В.Н. Абросимов, А.Н. Вьюнова, И.Б. Пономарева. - Текст : непосредственный // Клиническая медицина. - 2017. - Т.95, № 7. - С. 629-633. DOI: 10.18821/0023-2149-2017-95-629-633
26. Оценка кислородно-транспортной функции крови при ХОБЛ / Д.В. Василенко, А.В. Будневский, К.В. Боев [и др.]. - Текст : непосредственный // Аллергология и иммунология. - 2017. - Т. 18, № 3. - С. 185-186.
27. Перспективы фармакотерапии хронической обструктивной болезни легких: возможности комбинированных бронходилататоров и место ингаляционных глюкокортикостероидов. Заключение совета экспертов / С.Н. Авдеев, З.Р. Айсанов, А.С. Белевский [и др.]. - Текст : непосредственный // Пульмонология. - 2016. - Т. 26, № 1. - С. 65-72.
28. Показатели иммунного статуса при хронической обструктивной болезни легких / Д.А. Атякшин, Л.Н. Цветикова, Н.В. Лобеева [и др.]. - Текст : непосредственный // Современные наукоемкие технологии. - 2015. - № 9. - С. 195.
29. 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. DOI: 10.17816/KMJ2018-741
30. Респираторная медицина: руководство : в 3 т. / под ред. А. Г. Чучалина. - 2-е изд., перераб. и доп. - М. : Литтерра, 2017. - Т. 1. - 640 с. - Текст : непосредственный.
31. Современные методы оценки функционального состояния митохондрий / Г. А. Фрелих, Н.Ю. ПолOMEева, А.С. Васильев, В.В. Удут. - Текст : непосредственный // Сибирский медицинский журнал. - 2013. – Т. 28, № 3. - С. 7-13.

32. Стародубов, В. И. Анализ основных тенденций изменения заболеваемости населения хроническими обструктивными болезнями легких и бронхоэктатической болезнью в Российской Федерации в 2005–2012 годах / В.И. Стародубов, Р.А. Леонов, Д.Ш. Вайсман. - Текст : непосредственный // Медицина. - 2013. - № 4. - С.1–31.
33. Федеральные клинические рекомендации. Хроническая обструктивная болезнь легких / МЗ РФ. – М.,2016. - Текст : непосредственный.
34. Фомина, М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 192 с. - Текст : непосредственный.
35. Фомина, М.А. Способ комплексной оценки содержания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях: методические рекомендации / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина; ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. - Рязань: РИО РязГМУ, 2014. - 60 с. - Текст : непосредственный.
36. Характеристика эндемических факторов риска хронической обструктивной болезни легких в республике коми / Ю.Г. Крылова, В.И. Трофимов, А.А. Потапчук, Л.А. Заровкина. - Текст : непосредственный // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. - 2018. - Т. 25, № 1. - С. 45-49.
37. Экспрессия негативных регуляторов транскрипции генов в мононуклеарных клетках периферической крови больных бронхиальной астмой / В.В. Лим, В.А. Иванов, Л.Н. Сорокина [и др.]. - Текст : непосредственный // Медицинская иммунология.- 2016.- Т.18, № 5.- С. 451-458.
38. 4-Hydroxy-2-Nonenal, a Specific Lipid Peroxidation Product, Is Elevated in Lungs of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease / I. Rahman, A.A. van Schadewijk, A.J. Crowther [et al.]. - Text : visual // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2002. - Vol. 166, №4. - P.490–495. DOI: 10.1164/rccm.2110101
39. A 4-Year Trial of Tiotropium in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / D.P. Tashkin, B. Celli, S. Senn [et al.]. - Text : visual // N. Engl. J. Med. - 2008. - Vol. 359, № 15. - P.1543–1554. DOI: 10.1056/NEJMoa0805800

40. A comprehensive analysis of oxidative stress in the ozone-induced lung inflammation mouse model / C.H. Wiegman, F. Li, C.J. Clarke [et al.]. - Text : visual // Clin. Sci. - 2014. - Vol. 126, №6. - P.425–440. DOI: 10.1042/CS20130039.
41. A monitor for Cellular Oxygen METabolism (COMET): monitoring tissue oxygenation at the mitochondrial level / R. Ubbink, M.A.W. Bettink, R. Janse [et al.]. - Text : visual // J. Clin. Monit. Comput. - 2017. - Vol. 31, №6. - P.1143–1150. DOI: 10.1007/s10877-016-9966-x
42. A preliminary study in the alterations of mitochondrial respiration in patients with carbon monoxide poisoning measured in blood cells / D.H. Jang, M. Kelly, K. Hardy [et al.]. - Text : visual // Clin. Toxicol. - 2017. - Vol. 55, №6. - P.579–584. DOI: 10.1080/15563650.2017.1288912
43. Ackerman, J.L. The emerging soft tissue paradigm in orthodontic diagnosis and treatment planning / J.L. Ackerman, W.R. Proffit, D.M. Sarver. - Text : visual // Clin. Orthod. Res.- 1999. - Vol. 2, №2. - P.49–52. DOI: 10.1111/ocr.1999.2.2.49
44. Aerobic training decreases bronchial hyperresponsiveness and systemic inflammation in patients with moderate or severe asthma: a randomised controlled trial / A. França-Pinto, F.A. Mendes, R.M. de Carvalho-Pinto [et al.]. - Text : visual // Thorax. - 2015. - Vol. 70, №8. - P.732–739. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206070
45. Agrawal, A. Obesity, Metabolic Syndrome, and Airway Disease / A. Agrawal, Y.S. Prakash. - Text : visual // Immunol. Allergy Clin. North Am. - 2014. - Vol. 34, №4. - P.785–796. DOI: 10.1016/j.iac.2014.07.004
46. Agrawal, A. Rejuvenating cellular respiration for optimizing respiratory function: targeting mitochondria / A. Agrawal, U. Mabalirajan. - Text : visual // Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol. - 2016. - Vol. 310, №2. - P.103–113. DOI: 10.1152/ajplung.00320.2015
47. Agusti, A. The path to personalised medicine in COPD / A. Agusti. - Text : visual // Thorax. - 2014. - Vol. 69, №9. - P.857–864. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-205507
48. Agusti, A., The COPD control panel: Towards personalised medicine in COPD / A. Agusti, W. MacNee. - Text : visual // Thorax. - 2013. - Vol. 68, №7. - P.687–690. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2012-202772

49. Air pollution derived PM<sub>2.5</sub> impairs mitochondrial function in healthy and chronic obstructive pulmonary diseased human bronchial epithelial cells / B. Leclercq, J. Kluza, S. Antherieu [et al.]. - Text : visual // Environ. Pollut. - 2018. - Vol. 243. - P.1434–1449. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.09.062
50. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease / S. Sethi, J. Maloney, L. Grove, [et al.]. - Text : visual // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2006. - Vol. 173, №9. - P.991–998. DOI: 10.1164/rccm.200509-1525OC
51. Airway mucosal inflammation in COPD is similar in smokers and ex-smokers: A pooled analysis / E. Gamble, D.C. Grootendorst, K. Hattotuwa [et al.]. - Text : visual // Eur. Respir. J. - 2007. - Vol. 30, №3. - P. 467–471. DOI: 10.1183/09031936.00013006
52. Akhmedov, A.T. Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal / A.T. Akhmedov, J. Marín-García. - Text : visual // Mol. Cell. Biochem. - 2015. - Vol. 409, №1–2. - P.283–305. DOI: 10.1007/s11010-015-2532-x
53. Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes / M.E. Widlansky, J. Wang, S.M. Shenouda [et al.]. - Text : visual // Transl. Res. - 2010. - Vol. 156, №1. - P.15–25. DOI: 10.1016/j.trsl.2010.04.001
54. Alvarado, A. Autoimmunity in chronic obstructive pulmonary disease: Un Update / A. Alvarado. - Text : visual // Clin. Res. Trials. - 2018. - Vol. 4, №3. - P.1–9. DOI: 10.15761/CRT.1000222
55. Animal models of COPD: What do they tell us? / B. Jones, C. Donovan, G. Liu [et al.]. - Text : visual // Respirology. - 2017. - Vol. 22, №1. - P.21–32. DOI: 10.1111/resp.12908
56. Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema / S.H. Lee, S. Goswami, A. Grudo [et al.]. - Text : visual // Nat. Med. - 2007. - Vol. 13, №5. - P.567–569. DOI: 10.1038/nm1583
57. Ariza, A.C. The Succinate Receptor as a Novel Therapeutic Target for Oxidative and Metabolic Stress-Related Conditions / A.C. Ariza, P.M. Deen, J.H. Robben. - Text :

visual // Front. Endocrinol. (Lausanne). - 2012. - Vol. 3. - P.1–8. DOI: 10.3389/fendo.2012.00022

58. Assessment of Hepatic Mitochondrial Oxidation and Pyruvate Cycling in NAFLD by <sup>13</sup>C Magnetic Resonance Spectroscopy / K.F. Petersen, D.E. Befroy, S. Dufour [et al.]. - Text : visual // Cell Metab. - 2016. - Vol. 24, №1. - P.167–171. DOI: 10.1016/j.cmet.2016.06.005

59. Assessment of real-time myocardial uptake and enzymatic conversion of hyperpolarized [1-<sup>13</sup>C]pyruvate in pigs using slice selective magnetic resonance spectroscopy / L. Menichetti, F. Frijia, A. Flori [et al.]. - Text : visual // Contrast Media Mol. Imaging. - 2012. - Vol. 7, №1. - P.85–94. DOI: 10.1002/cmimi.480

60. Autoimmunity and COPD: Clinical Implications / G. Caramori, P. Ruggeri, A. Di Stefano [et al.]. - Text : visual // Chest. - 2018. - Vol. 153, №6. - P.1424–1431. DOI: 10.1016/j.chest.2017.10.033

61. Bardella, C. SDH mutations in cancer / C. Bardella, P.J. Pollard, I. Tomlinson. - Text : visual // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. - 2011. - Vol. 1807, №11. - P.1432–1443. DOI: 10.1016/j.bbabi.2011.07.003

62. Barnes, P.J. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease / P.J. Barnes. - Text : visual // Clin. Chest Med. - 2014. - Vol. 35, №1. - P.71–86. DOI: 10.1016/j.ccm.2013.10.004

63. Barnes, P.J. Role of HDAC2 in the Pathophysiology of COPD / P.J. Barnes. - Text : visual // Annu. Rev. Physiol. - 2009. - Vol. 71, №1. - P.451–464. DOI: 10.1146/annurev.physiol.010908.163257

64. Bartosz, G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? / G. Bartosz. - Text : visual // Biochem. Pharmacol. - 2009. - Vol. 77, №8. - P.1303–1315. DOI: 10.1016/j.bcp.2008.11.009

65. Beek, J.H.G.M. Van Understanding the physiology of the ageing individual: Computational modelling of changes in metabolism and endurance / J.H.G.M. Van Beek, T.B.L. Kirkwood, J.B. Bassingthwaite. - Text : visual // Interface Focus. - 2016. - Vol. 6, №2. DOI: 10.1098/rsfs.2015.0079

66. Brusselle, G.G. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease / G.G. Brusselle, G.F. Joos, K.R. Bracke. - Text : visual // *Lancet*. - 2011. - Vol. 378, №9795. - P.1015–1026. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60988-4.
67. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins / R.L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, E. Shacter [et al.]. - Text : visual // *Methods Enzymol*. - 1994.- Vol.233. - P.346–357. DOI: 10.1016/s0076-6879(94)33040-9
68. Celli, B.R. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / B.R. Celli, P.J. Barnes. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2007. - Vol. 29, №6. - P.1224–1238. DOI: 10.1183/09031936.00109906
69. Chandel, N.S. Evolution of Mitochondria as Signaling Organelles / N.S. Chandel. - Text : visual // *Cell Metab.* - 2015. - Vol. 22, №2. - P.204–206. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.05.013
70. Characterisation and prognosis of undiagnosed chronic obstructive pulmonary disease patients at their first hospitalisation / E. Balcells, E. Gimeno-Santos, J. de Batlle [et al.]. - Text : visual // *BMC Pulm. Med.* - 2015. - Vol. 15, № 1. - P.4. DOI: 10.1186/1471-2466-15-4.
71. Characterization of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort / A. Agustí, P.M. Calverley, B. Celli [et al.]. - Text : visual // *Respir. Res.* - 2010. - Vol. 11, №1. - P.122. DOI: 10.1186/1465-9921-11-122.
72. Chronic obstructive bronchopulmonary disease / G.F. Filley, H. J. Beckwitt, J.T. Reeves, R. S. Mitchell. - Text : visual // *Am. J. Med.*- 1968. - Vol. 44, №1. - P.26–38. DOI: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(68\)90234-9](https://doi.org/10.1016/0002-9343(68)90234-9)
73. Chronic obstructive pulmonary disease phenotypes: The future of COPD / M.L.K. Han, A. Agustí, P.M. Calverley [et al.]. - Text : visual // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2010. - Vol. 182, №5. - P.598–604. DOI: 10.1164/rccm.200912-1843CC
74. Cigarette smoke selectively enhances viral PAMP- and virus-induced pulmonary innate immune and remodeling responses in mice / M.J. Kang, C.G. Lee, J.Y. Lee [et al.]. - Text : visual // *J. Clin. Invest.* - 2008. - Vol. 118, №8. - P.2771–2784. DOI: 10.1172/JCI32709.

75. Cigarette smoke-induced blockade of the mitochondrial respiratory chain switches lung epithelial cell apoptosis into necrosis / M. Toorn, D.J. Slebos, H.G. de Bruin [et al.]. - Text : visual // *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* - 2007. - Vol. 292, №5. - P.1211–1218. DOI: 10.1152/ajplung.00291.2006
76. Circulating biomarkers of oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review / E. Zinellu, A. Zinellu, A.G. Fois [et al.]. - Text : visual // *Respir. Res.* - 2016. - Vol. 17, №1. - P.150. DOI: 10.1186/s12931-016-0471-z
77. Circulating Succinate is Elevated in Rodent Models of Hypertension and Metabolic Disease / N. Sadagopan, W. Li, S.L. Roberds [et al.]. - Text : visual // *Am. J. Hypertens.* - 2007. - Vol. 20, №11. - P.1209–1215. DOI: 10.1016/j.amjhyper.2007.05.010
78. Cloonan, S.M. Mitochondria: commanders of innate immunity and disease? / S.M. Cloonan, A.M. Choi. - Text : visual // *Curr. Opin. Immunol.* - 2012. - Vol. 24, №1. - P.32–40. DOI: 10.1016/j.coi.2011.11.001
79. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: analysis of results obtained in the DULCIS study / G. Palareti, C. Legnani, B. Cosmi [et al.]. - Text : visual // *Int. J. Lab. Hematol.* - 2016. - Vol. 38, №1. - P.42–49. DOI: 10.1111/ijlh.12426.
80. COPD phenotypes: differences in survival / J. Hernández Vázquez, I. Ali García, R. Jiménez-García [et al.]. - Text : visual // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* - 2018. - Vol. 13. - P.2245–2251. DOI: 10.2147/COPD.S166163
81. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema / K. Imai, B.A. Mercer, L.L. Schulman [et al.]. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2005. - Vol. 25, №2. - P.250–258. DOI: 10.1183/09031936.05.00023704
82. Cosio, M.G. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / M.G. Cosio, M. Saetta, A. Agusti. - Text : visual // *N. Engl. J. Med.* - 2009. - Vol. 360, №23. - P.2445–2454. DOI: 10.1056/NEJMra0804752.
83. Cossarizza, A. Flow Cytometric Analysis of Mitochondrial Membrane Potential Using JC-1 / A. Cossarizza, S. Salvioli. - Text : visual // *Curr Protoc Cytom.* - 2001. – Vol. 13, N 1. - P.1–7. DOI: 10.1002/0471142956.cy0914s13.

84. Cottrill, K.A. Hypoxamirs and Mitochondrial Metabolism / K.A. Cottrill, S.Y. Chan, J. Loscalzo. - Text : visual // *Antioxid. Redox Signal.* - 2014. - Vol. 21, №8. - P.1189–1201. DOI: 10.1089/ars.2013.5641
85. Could Mitochondrial Dysfunction Be a Differentiating Marker Between Chronic Fatigue Syndrome and Fibromyalgia? / J. Castro-Marrero, M.D. Cordero, N. Sáez-Francas [et al.]. - Text : visual // *Antioxid. Redox Signal.* - 2013. - Vol. 19, №15. - P.1855–1860. DOI: 10.1089/ars.2013.5346
86. Current concepts in targeting chronic obstructive pulmonary disease pharmacotherapy: making progress towards personalised management / P.G. Woodruff, A. Agusti, N. Roche [et al.]. - Text : visual // *Lancet.* - 2015. - Vol. 385, №9979. - P.1789–1798. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60693-6.
87. Cutaneous respirometry by dynamic measurement of mitochondrial oxygen tension for monitoring mitochondrial function in vivo / F.A. Harms, W.J. Voorbeijtel, S.I. Bodmer [et al.]. - Text : visual // *Mitochondrion.* - 2013. - Vol. 13, №5. - P.507–514. DOI: 10.1016/j.mito.2012.10.005
88. Decramer, M. Treatment of COPD: The sooner the better? / M. Decramer, C.B. Cooper. - Text : visual // *Thorax.* - 2010. - Vol. 65, № 9. - P.837–841. DOI: 10.1136/thx.2009.133355.
89. Decreased histone deacetylase 2 impairs Nrf2 activation by oxidative stress / N. Mercado, R. Thimmulappa, C.M. Thomas [et al.]. - Text : visual // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2011. - Vol. 406, №2. - P.292–298. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.035.
90. Determinants of Underdiagnosis of COPD in National and International Surveys / B. Lamprecht, J.B. Soriano, M. Studnicka [et al.]. - Text : visual // *Chest.* - 2015. - Vol. 148, № 4. - P.971–985. DOI: 10.1378/chest.14-2535. DOI: 10.1378/chest.14-2535.
91. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver [et al.]. - Text : visual // *Seminars in Arthritis and Rheumatism.* - 1990. - P.464–478. DOI: 10.1016/0076-6879(90)86141-h
92. Development and first validation of the COPD Assessment Test / P.W. Jones, G. Harding, P. Berry [et al.]. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2009. - Vol. 34, №3. - P.648–654. DOI: 10.1183/09031936.00102509.

93. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: Examination by western blot immunoassay / E. Shacter, J.A. Williams, M. Lim, R.L. Levine - Text : visual // *Free Radic. Biol. Med.* 1994. - Vol. 17, №5. - P.429–437. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90169-4
94. Direct Human Mitochondrial Transfer: A Novel Concept Based on the Endosymbiotic Theory / T. Kitani, D. Kami, T. Kawasaki [et al.]. - Text : visual // *Transplant. Proc.* - 2014. - Vol. 46, №4. - P.1233–1236. DOI: 10.1016/j.transproceed.2013.11.133
95. Diversity of epithelial stem cell types in adult lung / F. Li, J. He, J. Wei [et al.]. - Text : visual // *Stem Cells Int.* - 2015. - Vol. 2015. - P.17–21. DOI: 10.1155/2015/728307.
96. Dröse, S. Differential effects of complex II on mitochondrial ROS production and their relation to cardioprotective pre- and postconditioning / S. Dröse. - Text : visual // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2013. - Vol. 1827, №5. - P.578–587. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.01.004
97. Duarte, F. The Role of microRNAs in Mitochondria: Small Players Acting Wide / F. Duarte, C. Palmeira, A. Rolo. - Text : visual // *Genes (Basel)*. - 2014. - Vol. 5, №4. - P.865–886. DOI: 10.3390/genes5040865
98. Effect of tiotropium on outcomes in patients with moderate chronic obstructive pulmonary disease (UPLIFT): a prespecified subgroup analysis of a randomised controlled trial / M. Decramer, B. Celli, S. Kesten [et al.]. - Text : visual // *Lancet*. - 2009. - Vol. 374, №9696. - P.1171–1178. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61298-8
99. Efficacy of salmeterol/fluticasone propionate by GOLD stage of chronic obstructive pulmonary disease: Analysis from the randomised, placebo-controlled TORCH study / C.R. Jenkins, P.W. Jones, P.M. Calverley, [et al.]. - Text : visual // *Respir. Res.* - 2009. - Vol. 10. - P.1–9. DOI: 10.1186/1465-9921-10-59.
100. Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: A randomised controlled trial / R. Siva, R.H. Green, C.E. Brightling [et al.]. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2007. - Vol. 29, №5. - P.906–913. DOI: 10.1183/09031936.00146306

101. Eriksson, S. Pulmonary emphysema and alpha1-antitrypsin deficiency / S. Eriksson. - Text : visual // Acta Med Scand. - 1964. - Vol. 175. – P. 197-205. DOI: 10.1111/j.0954-6820.1964.tb00567.x
102. Evaluation of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / S. Singh, S.K. Verma, S. Kumar [et al.]. - Text : visual // Scand J Immunol. - 2017. - P.130–137. DOI: 10.1111/sji.12498
103. Ferritin oxidation and proteasomal degradation: Protection by antioxidants / P. Voss, L. Horakova, M. Jakstadt [et al.]. - Text : visual // Free Radic. Res. - 2006. - Vol. 40, №7. - P.673–683. DOI: 10.1080/10715760500419357
104. Fischer, B.M. Pathogenic triad in COPD: Oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation / B.M. Fischer, E. Pavlisko, J.A. Voynow. - Text : visual // Int. J. COPD. - 2011. - Vol. 6, №1. - P.413–421. DOI: 10.2147/COPD.S10770
105. Forfia, P.R. Pulmonary Heart Disease: The Heart-Lung Interaction and its Impact on Patient Phenotypes / P.R. Forfia, A. Vaidya, S.E. Wiegers. - Text : visual // Pulm. Circ. - 2013. - Vol. 3, №1. - P.5–19. DOI: 10.4103/2045-8932.109910
106. Fukuchi, Y. The Aging Lung and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Similarity and Difference / Y. Fukuchi. - Text : visual // Proc. Am. Thorac. Soc. - 2009. - Vol. 6, №7. - P.570–572.
107. Galluzzi, L. Organelle-specific initiation of cell death / L. Galluzzi, J.M. Bravo-San Pedro, G. Kroemer. - Text : visual // Nat. Cell Biol. - 2014. - Vol. 16, №8. - P.728–736. DOI: 10.1038/ncb3005
108. Gayan-Ramirez, G. Mechanisms of striated muscle dysfunction during acute exacerbations of COPD / G. Gayan-Ramirez, M. Decramer. - Text : visual // J. Appl. Physiol. - 2013. - Vol. 114, №9. - P.1291–1299. DOI: 10.1152/jappphysiol.00847.2012
109. Gene Expression Profiling in Vastus Lateralis Muscle During an Acute Exacerbation of COPD / T. Crul, D. Testelmans, M.A. Spruit [et al.]. - Text : visual // Cell Physiol Biochem. - 2010. - Vol. 25. - P.491–500. DOI: 10.1159/000303054
110. Global and regional estimates of COPD prevalence: Systematic review and meta-analysis / D. Adeloye, S. Chua, C. Lee [et al.]. - Text : visual // J. Glob. Health. - 2015. - Vol. 5, №2. DOI: 10.7189/jogh.05-020415.

111. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD).- Updated 2019. - Text : visual.- URL: <http://www.goldcopd.com>

112. Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins / J.R. Requena, C.C. Chao, R.L. Levine, E.R. Stadtman. - Text : visual // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2001. - Vol. 98, №1. - P.69–74. DOI: 10.1073/pnas.011526698

113. Go, Y. The cysteine proteome / Y. Go, J.D. Chandler, D.P. Jones. - Text : visual // Free Radic. Biol. Med. - 2015. - Vol. 84. - P.227–245. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.022

114. Grune, T. Degradation of Oxidized Proteins in K562 Human Hematopoietic Cells by Proteasome / T. Grune, T. Reinheckel, K.J.A. Davies. - Text : visual // J. Biol. Chem. 1996. - Vol. 271, №26. - P.15504–15509. DOI: 10.1074/jbc.271.26.15504

115. Handy, D.E. Redox Regulation of Mitochondrial Function / D.E. Handy, J. Loscalzo. - Text : visual // Antioxid. Redox Signal. - 2012. - Vol. 16, №11. - P.1323–1367. DOI: 10.1089/ars.2011.4123

116. Heterogeneity in the respiratory symptoms of patients with mild-to-moderate COPD / K.M. Johnson, A. Safari, W.C. Tan [et al.]. - Text : visual // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. - 2018. - Vol. 13. - P.3983–3995. DOI: 10.2147/COPD.S184424

117. HNE Michael Adducts to Histidine and Histidine-Containing Peptides as Biomarkers of Lipid-Derived Carbonyl Stress in Urines: LC–MS/MS Profiling in Zucker Obese Rats / M. Orioli, G. Aldini, M.C. Benfatto [et al.]. - Text : visual // Anal. Chem. - 2007. - Vol. 79, №23. - P.9174–9184. DOI: 10.1021/ac7016184

118. Hogg, J.C. The Contribution of Small Airway Obstruction to the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / J.C. Hogg, P.D. Paré, T.-L. Hackett. - Text : visual // Physiol. Rev. - 2017. - Vol. 97, №2. - P.529–552. DOI: 10.1152/physrev.00025.2015.

119. Holmström, K.M. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling / K.M. Holmström, T. Finkel. - Text : visual // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. - 2014. - Vol. 15, №6. - P.411–421. DOI: 10.1038/nrm3801.

120. Hoppeler, H. Limits for oxygen and substrate transport in mammals / H. Hoppeler, E.R. Weibel. - Text : visual // J. Exp. Biol. - 1998. - Vol. - 201. - P.1051–64.

121. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3 / R.B. Seth, L. Sun, C.K. Ea, Z.J. Chen. [et al.]. - Text : visual // Cell. - 2005. - Vol. 122, №5. - P.669–682. DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.012

122. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification / Z. Zhang, M. Tan, Z. Xie [et al.]. - Text : visual // Nat. Chem. Biol. - 2011. - Vol. 7, №1. - P.58–63. DOI: 10.1038/nchembio.495.

123. Immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / R.A. Holloway, L.E. Donnelly. - Text : visual // Curr. Opin. Pulm. Med. - 2013. - Vol. 19, №2. - P.95–102. DOI: 10.1097/MCP.0b013e32835cfff5.

124. Impaired mitophagy leads to cigarette smoke stress-induced cellular senescence: implications for chronic obstructive pulmonary disease / T. Ahmad, I.K.Sundar, C.A. Lerner [et al.]. - Text : visual // FASEB J. - 2015. - Vol. 29, №7. - P.2912–2929. DOI: 10.1096/fj.14-268276

125. Increased nuclear DNA damage precedes mitochondrial dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from Huntington's disease patients / G. Askeland, Z. Dosoudilova, M.Rodinova [et al.]. - Text : visual // Sci. Rep. - 2018. - Vol. 8, №1. - P.1–9. DOI: 10.1038/s41598-018-27985-y

126. Iverson, T.M. Catalytic mechanisms of complex II enzymes: A structural perspective / T.M. Iverson. - Text : visual // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. - 2013. - Vol. 1827, №5. - P.648–657. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.09.008

127. Jiménez-Osorio, A.S. Natural Nrf2 activators in diabetes / A.S. Jiménez- Osorio, S. González-Reyes, J. Pedraza-Chaverri. - Text : visual // Clin. Chim. Acta. - 2015. - Vol. 448. - P.182–192. DOI: 10.1016/j.cca.2015.07.009

128. Jindal, S. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers - Is it a different phenotype? / S. Jindal. - Text : visual // Indian J. Med. Res. - 2018. - Vol. 147, №4. - P.337. DOI: 10.4103/ijmr.IJMR\_10\_18

129. Kang, M.J. A mitochondrial perspective of chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis / M.J. Kang, G.S. Shadel. - Text : visual // *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. - 2016. - Vol. 79, №4. - P.207–213. DOI: 10.4046/trd.2016.79.4.207

130. Kondrashova, M.N. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine / M.N. Kondrashova, N.M. Doliba. - Text : visual // *FEBS Lett.* - 1989. - Vol. 243, №2. - P.153–155. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80119-x

131. Kurien, B.T. Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens / B.T. Kurien, R.H. Scofield. - Text : visual // *Autoimmun. Rev.* - 2008. - Vol. 7, №7. - P.567–573. DOI: 10.1016/j.autrev.2008.04.019

132. L-Arginine reduces mitochondrial dysfunction and airway injury in murine allergic airway inflammation / U. Mabalirajan, T. Ahmad, G.D. Leishangthem [et al.]. - Text : visual // *Int. Immunopharmacol.* - 2010. - Vol. 10, №12. - P.1514–1519. DOI: 10.1016/j.intimp.2010.08.025

133. Lee, W. Oxidative Stress in COPD and its measurement through exhaled breath condensate / W. Lee, P.S. Thomas. - Text : visual // *Clin. Transl. Sci.* - 2009. - Vol. 2, №2. - P.150–155. DOI: 10.1111/j.1752-8062.2009.00093.x

134. Lukyanova, L.D. Specific Features of Immediate Expression of Succinate-Dependent Receptor GPR91 in Tissues during Hypoxia / L.D. Lukyanova, Y.I. Kirova, E.L. Germanova. - Text : visual // *Bull. Exp. Biol. Med.* - 2016. - Vol. 160, №6. - P.742–747.

135. Lukyanova, L.D. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia / L.D. Lukyanova, Y.I. Kirova. - Text : visual // *Front. Neurosci.* - 2015. - Vol. 9. – P. 320. DOI: 10.3389/fnins.2015.00320

136. Lung function decline in male heavy smokers relates to baseline airflow obstruction severity / H. F.A.A. Mohamed, P. Zanen, H.M. Boezen [et al.]. - Text : visual // *Chest.* - 2012. - Vol. 142, №6. - P.1530–1538. DOI: 10.1378/chest.11-2837

137. Lung-Function Trajectories Leading to Chronic Obstructive Pulmonary Disease / P. Lange, B. Celli, A. Agustí [et al.]. - Text : visual // *N. Engl. J. Med.* - 2015. - Vol. 373, №2. - P.111–122. DOI: 10.1056/NEJMoa1411532

138. Mailloux, R.J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species / R.J. Mailloux. - Text : visual // *Redox Biol.* - 2015. - Vol. 4, №2. - P.381–398. DOI: 10.1016/j.redox.2015.02.001
139. Maklashina, E. The quinone-binding and catalytic site of complex II / E. Maklashina, G. Cecchini. - Text : visual // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* - 2010. - Vol. 1797, №12. - P.1877–1882. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.02.015
140. Malik, A.N. Is mitochondrial DNA content a potential biomarker of mitochondrial dysfunction? / A.N. Malik, A. Czajka. - Text : visual // *Mitochondrion.* - 2013. - Vol. 13, №5. - P.481–492. DOI: 10.1016/j.mito.2012.10.011
141. Mathers, C.D. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030 / C.D. Mathers, D. Loncar. - Text : visual // *PLoS Med.* - 2006. - Vol. 3, №11. - P.e442. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030442
142. Mathur, S. Structural alterations of skeletal muscle in copd / S. Mathur, D. Brooks, C.R.F. Carvalho. - Text : visual // *Front. Physiol.* - 2014. - Vol. 5. - P.1–8. DOI: 10.3389/fphys.2014.00104
143. Mercado, N. Accelerated ageing of the lung in COPD: New concepts / N. Mercado, K. Ito, P.J. Barnes. - Text : visual // *Thorax.* - 2015. - Vol. 70, №5. - P.482–489. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2014-206084
144. Mesenchymal stem cells alleviate oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the airways / X. Li, C. Michaeloudes, Y. Zhang [et al.]. - Text : visual // *J. Allergy Clin. Immunol.* - 2018. - Vol. 141, №5. - P.1634–1645.e5. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.017
145. Metabolic changes of different high-resolution computed tomography phenotypes of COPD after budesonide-formoterol treatment / C. Wang, J.X. Li, D. Tang [et al.]. - Text : visual // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* - 2017. - Vol. 12. - P.3511–3521. DOI: 10.2147/COPD.S152134
146. Metformin in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial / A.W. Hitchings, D. Lai, P.W. Jones [et al.]. - Text : visual // *Thorax.* - 2016. - Vol. 71, №7. - P.587–593. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-208035

147. Midgley, A.W. Emergence of the verification phase procedure for confirming «true» o2max / A.W. Midgley, S. Carroll. - Text : visual // Scand. J. Med. Sci. Sport. - 2009. - Vol. 19, №3. - P.313–322. DOI: 10.1111/j.1600-0838.2009.00898.x

148. Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy / T. Ahmad, S. Mukherjee, B. Pattnaik [et al.]. - Text : visual // EMBO J. - 2014. - Vol. 33, №9. - P.994-1010. DOI: 10.1002/emboj.201386030

149. Mitochondria in chronic obstructive pulmonary disease and lung cancer: where are we now? / H.-S. Nam, E. Izumchenko, S. Dasgupta [et al.]. - Text : visual // Biomark. Med. - 2017. - Vol. 11, №6. - P.475–489. DOI: 10.2217/bmm-2016-0373

150. Mitochondria in Lung Diseases / B. Aravamudan, M.A. Thompson, C.M. Pabelick [et al.]. - Text : visual // Expert Rev Respir Med. - 2013. - Vol. 7, №6. - P.631–646. DOI: 10.1586/17476348.2013.834252

151. Mitochondrial dysfunction and cerebral metabolic abnormalities in patients with mitochondrial encephalomyopathy subtypes: Evidence from proton MR spectroscopy and muscle biopsy / F.-N. Niu, H.L. Meng, L.L. Chang [et al.]. - Text : visual // CNS Neurosci. Ther. - 2017. - Vol. 23, №8. - P.686–697. DOI: 10.1111/cns.12714

152. Mitochondrial functioning abnormalities observed in blood platelets of chronic smoke-exposed guinea pigs - a pilot study / A.J. Białas, K. Siewiera, C. Watała [et al.]. - Text : visual // Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis. - 2018. - Vol. 13. - P.3707–3717. DOI: 10.2147/COPD.S175444

153. Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations / H. Chen, M. Vermulst, Y.E. Wang [et al.]. - Text : visual // Cell. - 2010. - Vol. 141, №2. - P.280–289. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.026

154. Mitochondrial iron chelation ameliorates cigarette smoke–induced bronchitis and emphysema in mice / S.M. Cloonan, K. Glass, M.E. Laucho-Contreras [et al.]. - Text : visual // Nat. Med. - 2016. - Vol. 22, №2. - P.163–174. DOI: 10.1038/nm.4021

155. Mitochondrial proton and electron leaks / M. Jastroch, A.S. Divakaruni, S. Mookerjee [et al.]. - Text : visual // Essays Biochem. - 2010. - Vol. 47. - P.53–67. DOI: 10.1042/bse0470053

156. Mitochondrial Regulation of Inflammasome Activation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / C.M. Yoon, M. Nam, Y.M. Oh [et al.]. - Text : visual // *J. Innate Immun.* - 2016. - Vol. 8, №2. - P.121–128. DOI: 10.1159/000441299

157. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD / K. Mizumura, S.M. Cloonan, K. Nakahira [et al.]. - Text : visual // *J. Clin. Invest.* - 2014. - Vol. 124, №9. - P.3987–4003. DOI: 10.1172/JCI74985

158. Molecular basis of reduced birth weight in smoking pregnant women: mitochondrial dysfunction and apoptosis / G. Garrabou, A.S. Hernández, M. Catalán García [et al.]. - Text : visual // *Addict. Biol.* - 2016. - Vol. 21, №1. - P.159–170. DOI: 10.1111/adb.12183

159. Murray, C.J.L. Measuring the Global Burden of Disease / C.J.L. Murray, A.D. Lopez. - Text : visual // *Lancet.* - 2017. - Vol. 390, №10100. - P.1460–1464. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)32367-X

160. NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of different plant species / X.-L. Wang, T. Takai, S. Kamijo [et al.]. - Text : visual // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2009. - Vol. 387, №3. - P.430–434. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.07.020

161. Naviaux, R.K. Metabolic features of the cell danger response / R.K. Naviaux. - Text : visual // *Mitochondrion.* - 2014. - Vol. 16, №87. - P.7–17. DOI: 10.1016/j.mito.2013.08.006

162. Network medicine, multimorbidity and the lung in the elderly / R. Faner, T. Cruz, A. López-Giraldo [et al.]. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2014. - Vol. 44, №3. - P.775–788. DOI: 10.1183/09031936.00078714

163. Nicks, M.E. Plasma antioxidants are associated with impaired lung function and COPD exacerbations in smokers / M.E. Nicks, M.M. O'Brien, R.P. Bowler. - Text : visual // *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* - 2011. - Vol. 8, №4. - P.264–269. DOI: 10.3109/15412555.2011.579202

164. Niewoehner, D.E. Pathologic Changes in the Peripheral Airways of Young Cigarette Smokers / D.E. Niewoehner, J. Kleinerman, D.B. Rice. - Text : visual // *N. Engl. J. Med.* - 1974. - Vol. 291, №15. - P.755–758. DOI: 10.1056/NEJM197410102911503

165. Nishimura, K. Dyspnea Is a Better Predictor of 5-Year Survival Than Airway Obstruction in Patients With COPD / K. Nishimura, T. Izumi, M. Tsukino, T. Oga. - Text : visual // Chest. - 2002. - Vol. 121, №5. - P.1434–1440. DOI: 10.1378/chest.121.5.1434
166. Obstructive Lung Disease and Low Lung Function in Adults in the United States / D.M. Mannino, R.C. Gagnon, T.L. Petty, E. Lydick. - Text : visual // Arch. Intern. Med. - 2000. - Vol. 160, № 11. - P.1683. DOI: 10.1001/archinte.160.11.1683
167. Oxidation of the aromatic amino acids tryptophan and tyrosine disrupts their anabolic effects on bone marrow mesenchymal stem cells / M. El. Refaey, C.P. Watkins, E.J. Kennedy [et al.]. - Text : visual // Mol. Cell. Endocrinol. - 2015. - Vol. 410, №7. - P.87–96. DOI: 10.1016/j.mce.2015.01.034
168. Oxidative Stress and Respiratory Muscle Dysfunction in Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease / E. Barreiro, B. de la Puente, J. Minguella [et al.]. - Text : visual // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2005. - Vol. 171, №10. - P.1116–1124.
169. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases / A. Bhattacharyya, R. Chattopadhyay, S. Mitra [et al.]. - Text : visual // Physiol. Rev. - 2014. - Vol. 94, №2. - P.329–354. DOI: 10.1152/physrev.00040.2012.
170. Oxidative Stress–induced Antibodies to Carbonyl-modified Protein Correlate with Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease / P.A. Kirkham, G. Caramori, P. Casolari [et al.]. - Text : visual // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2011. - Vol. 184, №7. - P.796–802. DOI: 10.1164/rccm.201010-1605OC
171. Oxidative stress–induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease / C.H. Wiegman, C. Michaeloudes, G. Haji [et al.]. - Text : visual // J. Allergy Clin. Immunol. - 2015. - Vol. 136, №3. - P.769–780. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.01.04
172. Patel, M.N. Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Epilepsy / M.N. Patel. - Text : visual // Free Radic. Res. - 2002. - Vol. 36, №11. - P.1139–1146. DOI: 10.1080/1071576021000016391
173. Patient understanding, detection experience of COPD exacerbations: An observational, interview-based study / R. Kessler, E. Ståhl, C. Vogelmeier [et al.]. - Text

: visual // Chest. - 2006. - Vol. 130, №1. - P.133–142. DOI: <https://doi.org/10.1378/chest.130.1.133>

174. Peptidomic analysis of human blood specimens: Comparison between plasma specimens and serum by differential peptide display / H. Tammen, I. Schulte, R. Hess [et al.]. - Text : visual // Proteomics. - 2005. - Vol. 5, №13. - P.3414–3422. DOI: [10.1002/pmic.20040121](https://doi.org/10.1002/pmic.20040121)

175. Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: influence of RCAN1 and oxidative stress / D. Poppek, S. Keck, G. Ermak [et al.]. - Text : visual // Biochem. J. - 2006. - Vol. 400, №3. - P.511–520. DOI: [10.1042/BJ20060463](https://doi.org/10.1042/BJ20060463)

176. PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility / X. Wang, D. Winter, G. Ashrafi [et al.]. - Text : visual // Cell. - 2011. - Vol. 147, №4. - P.893–906. DOI: [10.1016/j.cell.2011.10.018](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.018)

177. Postma, D.S. The Asthma–COPD Overlap Syndrome / D.S. Postma, K.F. Rabe. - Text : visual // N. Engl. J. Med. - 2015. - Vol. 373, №13. - P.1241–1249. DOI: [10.1056/NEJMra1411863](https://doi.org/10.1056/NEJMra1411863)

178. Posttranslational modification of Sirt6 activity by peroxynitrite / S. Hu, H. Liu, Y. Ha. - Text : visual // Free Radic. Biol. Med. - 2015. - Vol. 79, №11. - P.176–185. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.011](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.011)

179. Preclinical evidence of mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide as an effective alarm parameter under hypoxia / H. Shi, N. Sun, A. Mayevsky [et al.]. - Text : visual // J. Biomed. Opt. - 2014. - Vol. 19, №1. - P.017005. DOI: [10.1117/1.JBO.19.1.017005](https://doi.org/10.1117/1.JBO.19.1.017005)

180. Prediction of the clinical course of chronic obstructive pulmonary disease, using the new GOLD classification: A study of the general population / P. Lange, J.L. Marott, J. Vestbo [et al.]. - Text : visual // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2012. - Vol. 186, №10. - P.975–981. DOI: [10.1164/rccm.201207-1299OC](https://doi.org/10.1164/rccm.201207-1299OC)

181. Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD / D.M. Mannino, D. Thorn, A. Swensen, F. Holguin [et al.]. - Text : visual // Eur. Respir. J. - 2008. - Vol. 32, №4. - P.962–969. DOI: [10.1183/09031936.00012408](https://doi.org/10.1183/09031936.00012408)

182. Prolonged cigarette smoke exposure alters mitochondrial structure and function in airway epithelial cells / R.F. Hoffmann, S. Zarrintan, S.M. Brandenburg [et al.]. - Text : visual // *Respir. Res.* - 2013. - Vol. 14, №1. - P.97. DOI: 10.1186/1465-9921-14-97
183. Protein Carbonyl Measurement by a Sensitive ELISA Method / H. Buss, T.P. Chan, K.B. Sluis, N.M. Domigan [et al.]. - Text : visual // *Free Radic. Biol. Med.* - 1997. - Vol. 23, №3. - P.361–366. DOI: 10.1016/s0891-5849(97)00104-4
184. Proteolysis in Cultured Liver Epithelial Cells during Oxidative Stress / T. Grune, T. Reinheckel, M. Joshi, K.J. Davies. - Text : visual // *J. Biol. Chem.* - 1995. - Vol. 270, №5. - P.2344–2351. DOI: 10.1074/jbc.270.5.2344
185. Rahman, I. Review: Antioxidant therapeutic advances in COPD / I. Rahman. - Text : visual // *Ther. Adv. Respir. Dis.* - 2008. - Vol. 2, №6. - P.351–374. DOI: 10.1177/1753465808098224
186. Real-time hemodynamic response and mitochondrial function changes with intracarotid mannitol injection / S. Joshi, R. Singh-Moon, M. Wang [et al.]. - Text : visual // *Brain Res.* - 2014. - Vol. 1549. - P.42–51. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.12.036
187. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease / G.C. Donaldson, T.A. Seemungal, A. Bhowmik, J.A. Wedzicha. - Text : visual // *Thorax.* - 2002. - Vol. 57, №10. - P.847–852. DOI: 10.1136/thorax.57.10.847
188. Resveratrol attenuates experimental allergic asthma in mice by restoring inositol polyphosphate 4 phosphatase (INPP4A) / J. Aich, U. Mabalirajan, T. Ahmad [et al.]. - Text : visual // *Int. Immunopharmacol.* - 2012. - Vol. 14, №4. - P.438–443. DOI: 10.1016/j.intimp.2012.08.017
189. Safety of Metformin in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Type 2 Diabetes Mellitus / A.W. Hitchings, J.R. Archer, S.A. Srivastava, E.H. Baker. - Text : visual // *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* - 2015. - Vol. 12, №2. - P.126–131. DOI: 10.3109/15412555.2015.898052
190. Salvi, S.S. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers / S.S. Salvi, P.J. Barnes. - Text : visual // *Lancet.* - 2009. - Vol. 374, №9691. - P.733–743. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61303-9

191. Schieber, M. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress / M. Schieber, N.S. Chandel. - Text : visual // *Curr. Biol.* - 2014. - Vol. 24, №10. - P.453–462. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034
192. Selective Oxidation of Methionine and Tryptophan Residues in a Therapeutic IgG1 Molecule / E. Folzer, K. Diepold, K. Bomans [et al.]. - Text : visual // *J. Pharm. Sci.* - 2015. - Vol. 104, №9. - P.2824–2831. DOI: 10.1002/jps.24509
193. Serban, K.A. Mouse models of COPD / K.A. Serban, I. Petrache. - Text : visual // *Methods Mol. Biol.* - 2018. - Vol. 1809. - P.379–394. DOI: 10.1007/978-1-4939-8570-8\_25.
194. Sexton, P. Respiratory Effects of Insulin Sensitisation with Metformin: A Prospective Observational Study / P. Sexton, P. Metcalf, J. Kolbe. - Text : visual // *COPD J. Chronic Obstr. Pulm. Dis.* - 2014. - Vol. 11, №2. - P.133–142. DOI: 10.3109/15412555.2013.808614.
195. S-glutathionylation in protein redox regulation / I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini [et al.]. - Text : visual // *Free Radic. Biol. Med.* - 2007. - Vol. 43, №6. - P.883–898.
196. Sies, H. Oxidative Stress / H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones. - Text : visual // *Annu. Rev. Biochem.* - 2017. - Vol. 86. - P. 715-748. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
197. Sies, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application / H. Sies. - Text : visual // *Am. J. Med.* - 1991. - Vol. 91, №3. - P.31–38. DOI: 10.1016/0002-9343(91)90281-2
198. SIRT5-Mediated Lysine Desuccinylation Impacts Diverse Metabolic Pathways / J. Park, Y. Chen, D.X. Tishkoff [et al.]. - Text : visual // *Mol. Cell.* - 2013. - Vol. 50, №6. - P.919–930. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.06.001
199. Spirometric predictors of lung function decline and mortality in early chronic obstructive pulmonary disease / M.B. Drummond, N.N. Hansel, J.E. Connett [et al.]. - Text : visual // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2012. - Vol. 185, №12. - P.1301–1306. DOI: 10.1164/rccm.201202-0223OC

200. Sputum eosinophilia and the short-term response to inhaled mometasone in chronic obstructive pulmonary disease / C.E. Brightling, S. McKenna, B. Hargadon [et al.]. - Text : visual // *Thorax*. - 2005. - Vol. 60, №3. - P.193–198. DOI: 10.1136/thx.2004.032516
201. Stable COPD: Predicting benefit from high-dose inhaled corticosteroid treatment / R. Leigh, M.M. Pizzichini, M.M. Morris [et al.]. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2006. - Vol. 27, №5. - P.964–971. DOI: 10.1183/09031936.06.00072105
202. Stadtman, E.R. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences / E.R. Stadtman. - Text : visual // *Free Radic. Biol. Med.* - 1990. - Vol. 9, №4. - P.315–325. DOI: 10.1016/0891-5849(90)90006-5
203. Stadtman, E.R. Protein Oxidation / E.R. Stadtman, R.L. Levine. - Text : visual // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. - Vol. 899, №1. - P.191–208. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x
204. Stockley, R.A.  $\alpha$ -1-Antitrypsin deficiency: clinical variability, assessment, and treatment / R.A. Stockley, A.M. Turner. - Text : visual // *Trends Mol. Med.* - 2014. - Vol. - 20, №2. - P.105–115. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.11.006
205. Succinate Dehydrogenase Mutation Underlies Global Epigenomic Divergence in Gastrointestinal Stromal Tumor / J.K. Killian, S.Y. Kim, M. Miettinen [et al.]. - Text : visual // *Cancer Discov.* - 2013. - Vol. 3, №6. - P.648–657. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-13-0092
206. Superoxide Dismutase 3 Polymorphism Associated with Reduced Lung Function in Two Large Populations / M. Dahl, R.P. Bowler, K. Juul, J.D. Crapo [et al.]. - Text : visual // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2008. - Vol.178, №9. - P. 906-912. DOI: 10.1164/rccm.200804-549OC
207. Sureshbabu, A. Targeting mitochondrial dysfunction in lung diseases: Emphasis on mitophagy / A. Sureshbabu, V. Bhandari. - Text : visual // *Front. Physiol.* - 2013. - Vol. 4. - P.1–8. DOI: 10.3389/fphys.2013.00384
208. Susceptibility to Exacerbation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease / J.R. Hurst, J. Vestbo, A. Anzueto [et al.]. - Text : visual // *N. Engl. J. Med.* - 2010. - Vol. 363, №12. - P.1128–1138. DOI: 10.1056/NEJMoa0909883

209. Taegtmeyer, H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles / H. Taegtmeyer. - Text : visual // *Circ. Res.* - 1978. - Vol. 43, №5. - P.808–815. DOI: 10.1161/01.res.43.5.808
210. Targeting mitochondria-derived reactive oxygen species to reduce epithelial barrier dysfunction and colitis / A. Wang, A.V. Keita, V. Phan [et al.]. - Text : visual // *Am. J. Pathol.* - 2014. - Vol. 184, №9. - P.2516–2527. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.05.019
211. Targeting phosphoinositide-3-kinase- $\delta$  with theophylline reverses corticosteroid insensitivity in chronic obstructive pulmonary disease / Y. To, K. Ito, Y. Kizawa [et al.]. - Text : visual // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* - 2010. - Vol. 182, №7. - P.897–904. DOI: 10.1164/rccm.200906-0937OC
212. The «real-life» COPD patient in Germany: The DACCORD study / H. Worth, R. Buhl, C.P. Criée [et al.]. - Text : visual // *Respir. Med.* - 2016. - Vol. 111. - P.64–71. DOI: 10.1016/j.rmed.2015.12.010
213. The aging lung / E.M. Lowery, A.L. Brubaker, E. Kuhlmann, E.J. Kovacs. - Text : visual // *Clin. Interv. Aging.* - 2013. - Vol. 8. - P.1489. DOI: 10.2147/CIA.S51152
214. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases / R. Franco, O.J. Schoneveld, A. Pappa, M.I. Panayiotidis. - Text : visual // *Arch. Physiol. Biochem.* - 2007. - Vol. 113, №4–5. - P.234–258. DOI: 10.1080/13813450701661198
215. The COPD assessment test: What do we know so far? A systematic review and meta-analysis about clinical outcomes prediction and classification of patients into gold stages / M. Karloh, M. A. Fleig, R. Maurici [et al.]. - Text : visual // *Chest.* - 2016. - Vol. 149, №2. - P. 413–425. DOI: 10.1378/chest.15-1752
216. The Hallmarks of Aging Carlos / C. López-otín, M. A. Blasco, L. Partridge [et al.]. - Text : visual // *Cell.* - 2013. - Vol. 153, №6. - P.1194–1217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039
217. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation / B.W.M. Willemsse, D.S. Postma, W. Timens, N.H. ten Hacken. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2004. - Vol. 23, №3. - P. 464–476. DOI: 10.1183/09031936.04.00012704

218. The influence of N-acetyl-L-cysteine on oxidative stress and nitric oxide synthesis in stimulated macrophages treated with a mustard gas analogue / V. Paromov, M. Qui, H. Yang [et al.]. - Text : visual // BMC Cell Biol. - 2008. - Vol. 9, №1. - P.33. DOI: 10.1186/1471-2121-9-33.

219. The Molecular Inflammatory Process in Aging / Hae C. Young, B. Sung, K.J. Jung [et al.]. - Text : visual // Antioxid. Redox Signal. - 2006. - Vol. 8, №10. - P.152–162. DOI: 10.1089/ars.2006.8.572

220. The PDE4 inhibitor roflumilast reduces weight gain by increasing energy expenditure and leads to improved glucose metabolism / J. Möllmann, F. Kahles, C. Leberherz [et al.]. - Text : visual // Diabetes, Obes. Metab. - 2017. - Vol. 19, №4. - P.496–508. DOI: 10.1111/dom.12839

221. The Phosphodiesterase 4 Inhibitor Roflumilast Protects against Cigarette Smoke Extract–Induced Mitophagy-Dependent Cell Death in Epithelial Cells / S.Y. Kyung, Y.J. Kim, E.S. Son [et al.]. - Text : visual // Tuberc. Respir. Dis. (Seoul). - 2018. - Vol. 81, №2. - P.138–147. DOI: 10.4046/trd.2017.0115.

222. The top 10 causes of death. - Text : visual // Fact sheets WHO.- 2018.- 24 May.- URL: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

223. Time Course and Recovery of Exacerbations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease / T.A.R. Seemungal, G.C. Donaldson, A. Bhowmik [et al.]. - Text : visual // Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2000. - Vol. 161, №5. - P.1608–1613. DOI: 10.1164/ajrccm.161.5.9908022

224. Tiotropium versus salmeterol for the prevention of exacerbations of COPD / C. Vogelmeier, B. Hederer, T. Glaab [et al.]. - Text : visual // N. Eng. J. Of Med. – 2011. – Vol.364, №12. -C.1093-1103. DOI: 10.1056/NEJMoa1008378

225. State of the Art. Cellular and Molecular Mechanisms of Alveolar Destruction in Emphysema: An Evolutionary Perspective / R.M. Tuder, T. Yoshida, W. Arap [et al.]. - Text : visual // Proc. Am. Thorac. Soc. - 2006. - Vol. 3, №6. - P.503–510. DOI: 10.1513/pats.200603-054MS

226. Tumour necrosis factor receptor-75 and risk of COPD exacerbation in the azithromycin trial / P.G. Woodruff, W. Chatila, J.E. Connett [et al.]. - Text : visual // *Eur. Respir. J.* - 2014. - Vol. 43, №1. - P.295–298. DOI: 10.1183/09031936.00140613
227. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species / J.F. Turrens. - Text : visual // *J. Physiol.* - 2003. - Vol. 552, №2. - P.335–344. DOI: 10.1113/jphysiol.2003.049478
228. Protein glycation, diabetes, and aging / P. Ulrich, A. Cerami. - Text : visual // *Recent Prog. Horm. Res.* - 2001. - Vol. 56. - P.1–21.
229. Venditti, P. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species / P. Venditti, L. Di Stefano, S. Di. Meo. - Text : visual // *Mitochondrion.* - 2013. - Vol. 13, №2. - P.71–82.
230. Vianna, E. Characteristics of undiagnosed COPD in a senior community center / E. Vianna, S. Santos, E. Lizzi. - Text : visual // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* - 2014. - Vol. 3, № 1. - P.1155. DOI: 10.2147/COPD.S49521
231. Weinberg, S.E. Mitochondria in the Regulation of Innate and Adaptive Immunity / S.E. Weinberg, L.A. Sena, N.S. Chandel. - Text : visual // *Immunity.* - 2015. - Vol. 42, №3. - P.406–417. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.02.002
232. West, A.P. Mitochondria in innate immune responses / A.P. West, G.S. Shadel, S. Ghosh. - Text : visual // *Nat. Rev. Immunol.* - 2011. - Vol. 11, №6. - P.389–402. DOI: 10.1038/nri2975.
233. Wood smoke exposure induces a decrease in respiration parameters and in the activity of respiratory complexes I and IV in lung mitochondria from guinea pigs / L.F. Granados-Castro, D.S. Rodríguez-Rangel, M. Montaña [et al.]. - Text : visual // *Environ. Toxicol.* - 2015. - Vol. 30, №4. - P.461–471. DOI: 10.1002/tox.21922.
234. Wood-Baker, R. Systemic corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: An overview of Cochrane systematic reviews / R. Wood-Baker, J. Walters, E. Haydn Walters. - Text : visual // *Respir. Med.* - 2007. - Vol. 101, №3. - P.371–377. DOI: 10.1016/j.rmed.2006.07.013
235. Yao, H. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease / H. Yao, I.

Rahman. - Text : visual // Toxicol. Appl. Pharmacol. - 2011. - Vol. 254, №2. - P.72–85.

DOI: 10.1016/j.taap.2009.10.022

236. Yoshida, T. Pathobiology of Cigarette Smoke-Induced Chronic Obstructive Pulmonary Disease / T. Yoshida, R.M. Tuder. - Text : visual // Physiol. Rev. - 2007. -

Vol. 87, №3. - P.1047–1082. DOI: 10.1152/physrev.00048.2006

237. Zorov, D.B. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release / D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott. - Text : visual // Physiol. Rev. -

2014. - Vol. 94, №3. - P.909–950. DOI: 10.1152/physrev.00026.2013