

ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ К ЛЕПТИНУ И АДИПОНЕКТИНУ В КОЖЕ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ ПРИ ПИТАТЕЛЬНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ХОБЛ

Екатерина Викторовна БУРЦЕВА, Вера Афанасьевна НЕВЗОРОВА,
Июсса Валерьевна ДЮЙЗЕН, Евгений Анатольевич КОЦЮРБИЙ

ГБОУ ВПО Владивостокский государственный медицинский университет Минздрава России
690002, г. Владивосток, пр. Острякова, 2

Исследована иммуноцитохимическая локализация рецепторов к лептину и адипонектину в тканях, полученных путем чрескожной тонкоигольной биопсии бедра, у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) с проявлениями питательной недостаточности. Обследовано 60 пациентов с I, II, III стадиями ХОБЛ и 20 здоровых добровольцев. Выявлено, что у здоровых людей рецепторы к адипокинам присутствуют в клетках кожи, подкожно-жировой клетчатке, сосудов, поперечнополосатой мускулатуры. Напротив, при ХОБЛ сигналы к адипокинам исчезают в мышечной ткани, рецепторная активность к лептину становится достоверно ниже, а к адипонектину – достоверно выше в прочих тканях бедра ($p < 0,05$). Дисбаланс в локализации рецепторов к адипокинам может свидетельствовать об их участии в развитии питательной недостаточности при ХОБЛ.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, питательная недостаточность, рецепторы к лептину и адипонектину, мышечная ткань, кожа.

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире. В связи с изменяющейся экологией, большим количеством курящих людей и старением населения прогнозируется рост смертности от данного заболевания [7]. Помимо диагностического важного критерия постановки диагноза ХОБЛ в виде прогрессирующего и частично необратимого ограничения воздушного потока для заболевания характерны системные проявления в виде аномальной композиции тела, дисфункции скелетных мышц (гипотрофии и атрофии скелетных мышц), нарушений сердечно-сосудистой и нервной систем, остеопороза и анемии [1, 2, 4, 6]. Особое место среди системных проявлений ХОБЛ занимает питательная недостаточность, фенотипическим проявлением которой является потеря мышечной массы. В ряду причин ее развития выделяют хроническое системное воспаление, увеличение работы дыхательной мускулатуры, повышение расхода энергии покоя в сочетании с недостаточным потреблением питательных веществ из-за тяжести основного заболевания и прогрессирования депрессии [2,

3, 5, 6]. Активно обсуждается роль процессов обмена адипокинов, лептина и адипонектина в патогенезе питательной недостаточности [3].

Механизм действия лептина связан с контролем процесса насыщения, получения удовлетворения от приема пищи. Гормон подает сигнал в гипоталамус через активацию специфических лептиновых рецепторов, локализованных в периферических тканях [3, 5, 8]. Курение, которое сопровождается развитием гиперadrenergического состояния, может способствовать снижению уровня лептина [3]. В отличие от лептина, адипонектин вовлечен в процессы глюконеогенеза, апоптоза, катаболизма жиров, развития эндотелиальной дисфункции, инсулинорезистентности и повышения массы тела. Установлены его противовоспалительные, антиатерогенные и антиоксидантные свойства [3, 8]. Адипонектин реализует свои эффекты через специфические рецепторы – Adipo1 и AdipoR2, первый из которых преимущественно локализован в тканях кожи, подкожной жировой клетчатке и поперечнополосатой мускулатуре и доступен для исследования [8].

В литературе присутствуют единичные данные о локализации рецепторов адипокинов в

Бурцева Е.В. – аспирант, e-mail:katriness@list.ru

Невзорова В.А. – д.м.н., проф., зав. кафедрой терапии

Дюйзен И.В. – д.м.н., руководитель ЦНИЛ

Коцюрбий Е.А. – к.м.н., доцент кафедры патологической анатомии

коже и мышечной ткани, что определяет актуальность проведенного исследования.

Цель исследования – определить локализацию рецепторов к лептину и адипонектину в клетках кожи и мышечной ткани при проявлениях питательной недостаточности у пациентов с ХОБЛ.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Обследованы 60 пациентов с фенотипическими проявлениями европейской расы, проживающие на территории Приморского края более 15 лет, в возрасте $63 \pm 2,1$ года, находившиеся на стационарном лечении в пульмонологическом отделении Городской клинической больницы № 1 и аллергореспираторном центре г. Владивостока в течение 2009–2010 гг. с диагнозом ХОБЛ (общая группа). Все больные были проинформированы о проведении исследования в полном объеме и дали информированное согласие на участие в нем. Контрольную группу составили 10 здоровых некурящих добровольцев, 8 мужчин и 2 женщины в возрасте $59 \pm 1,75$ года, не являющиеся родственниками лиц основной группы. Критериями исключения были бронхиальная астма, инфаркт миокарда, инсульт и другие тяжелые заболевания, злоупотребление алкоголем и наркотическими препаратами, старческий возраст, неспособность понять цели и задачи исследования, отказ от участия в исследовании. Для диагностики стадии ХОБЛ использовались рекомендации международной классификации GOLD 2008 г. [1]. Все обследованные пациенты на основании показателей постбронходилатационного теста ОФВ1 были разделены на 3 группы: I группа – 20 пациентов с ХОБЛ I стадии (ОФВ1 = $85 \pm 1,3$), II группа – 20 человек с ХОБЛ II стадии (ОФВ1 = $65 \pm 1,8$), III группа – 20 человек с ХОБЛ III стадии (ОФВ1 = $40 \pm 1,5$).

Для оценки питательной недостаточности были использованы методы анкетирования, антропометрических измерений и вычислений индекса массы тела (ИМТ), тощей массы тела

(ТМТ), окружности плеча, окружности мышц плеча, толщины кожно-жировой складки над трицепсом с помощью каллиперометрии.

Забор материала для гистологического и иммунофлуоресцентного исследования осуществляли посредством чрескожной тонкоигольной биопсии с использованием автоматической тонкоигольной биопсийной системы MAGNUM («Burd», Германия) и одноразовых стерильных игл с глубиной проникновения 22 мм. Забор биоптата проводился в анатомической проекции четырехглавой мышцы бедра. Материал фиксировался в течение 4 часов в 4%-м растворе забуферного параформальдегида. Для первичной регистрации и визуализации препарата использовалась стандартная окраска гематоксилином и эозином. В полученной биопсии были выявлены: кожа, подкожная соединительная ткань, включая подкожно-жировую клетчатку, мышечная ткань (поперечнополосатая мускулатура).

Для проведения иммунофлуоресцентной диагностики рецепторов лептина и адипонектина в клетках полученных биоптатов использовались первичные поликлональные кроличьи антитела: к рецептору адипонектина типа 1 (sc-99183, Santa Cruz Biotechnology, США), к рецептору лептина (1:100, ab60042, Abcam, Великобритания), и вторичные антитела Goat Anti-Rabbit IgG (H&L), DyLight 488 Conjugated (1:200, № 35552, Thermo Scientific, США). Иммунофлуоресцентное окрашивание выполнялось по общепринятой методике в соответствии с инструкциями фирм-изготовителей реактивов. Докраску ядер проводили DAPI (16:8000) в течение 1 мин. Окрашенные образцы исследовали на микроскопе Zeiss Axio Scope A1 с системой освещения Colibri, оснащенном цифровой камерой AxioCam MRc (Германия). В работе применялся набор фильтров с длиной волны 350 нм (для DAPI) и 488 нм (для FITC). Полученное изображение обрабатывалось в программе AxioVision LE V4.8.1.0. Для интерпретации полученных результатов использовали руководство по подсчету сигналов, предложенное компани-

Таблица

Соотношение ИМТ и ТМТ у пациентов с ХОБЛ

Показатель нутритивного статуса	Группа обследованных лиц				
	Группа контроля	Общая группа	ХОБЛ I стадии	ХОБЛ II стадии	ХОБЛ III стадии
ИМТ	$23,2 \pm 0,4$	$20,35 \pm 0,8$	$22,25 \pm 1,2$	$19,85 \pm 0,7$	$18,6 \pm 1,4$
ТМТ	$82,0 \pm 1,9$	$72,2 \pm 1,3^*$	$75,5 \pm 1,1^*$	$70,1 \pm 0,9^{* \#}$	$63,6 \pm 1,3^{* \# \&}$

Примечание. Статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от величины соответствующего показателя: * – группы контроля, # – пациентов с I стадией ХОБЛ, & – пациентов со II стадией ХОБЛ.

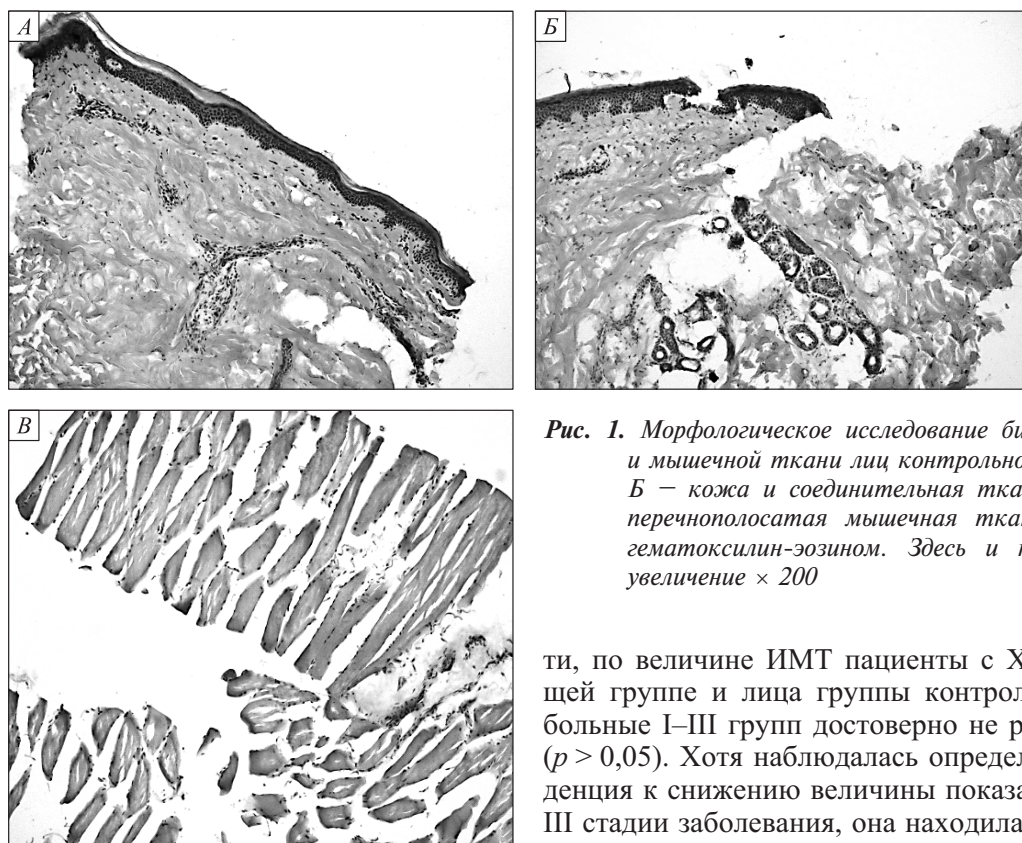


Рис. 1. Морфологическое исследование биопсии кожи и мышечной ткани лиц контрольной группы: А, Б — кожа и соединительная ткань; В — поперечнополосатая мышечная ткань. Окраска гематоксиллин-эозином. Здесь и на рис. 2–5 увеличение $\times 200$

ей Dako (Дания), — DakoCytomation. Учитывая объем материала, подсчет меченых структур проводился в трех полях зрения. Положительная экспрессия метки наблюдалась в цитоплазме и на мембране клеток.

Статистическую обработку результатов исследования проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляя в виде $M \pm m$. Различия между двумя независимыми группами оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, достоверными считались результаты при $p < 0,05$. Анализ взаимосвязей проводился непараметрическим методом корреляционного анализа Спирмена с вычислением ошибки коэффициента корреляции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У пациентов общей группы были установлены следующие антропометрические данные: средний рост $165 \pm 1,2$ см, средний вес $59 \pm 2,5$ кг. Индекс курящего человека (количество выкуренных в день сигарет $\times$ число месяцев в году, которые человек курил) составил $33 \pm 2,3$, стаж курения — $30 \pm 3,3$ года, что свидетельствует о высокой степени никотин-ассоциированного риска.

Согласно представленным в таблице результатам оценки питательной недостаточнос-

ти, по величине ИМТ пациенты с ХОБЛ в общей группе и лица группы контроля, а также больные I–III групп достоверно не различались ($p > 0,05$). Хотя наблюдалась определенная тенденция к снижению величины показателя от I к III стадии заболевания, она находилась в пределах референсных значений для здоровых людей (ИМТ $> 18,5$).

Напротив, ТМТ у всех пациентов ХОБЛ в общей группе была меньше, чем в группе контроля ($p < 0,005$). Результаты анализа значений ТМТ в зависимости от стадии ХОБЛ продемонстрировали, что потеря ТМТ происходит уже при I стадии ХОБЛ, становясь достоверно ниже, чем в контроле ($p < 0,05$). При II и III стадиях ХОБЛ величина ТМТ уменьшается еще значительнее, достигая минимальных результа-



Рис. 2. Рецепторы к лептину в коже и мышечной ткани группы контроля (здесь и на рис. 3–5 иммунофлуоресцентное исследование; а — положительная экспрессия метки)

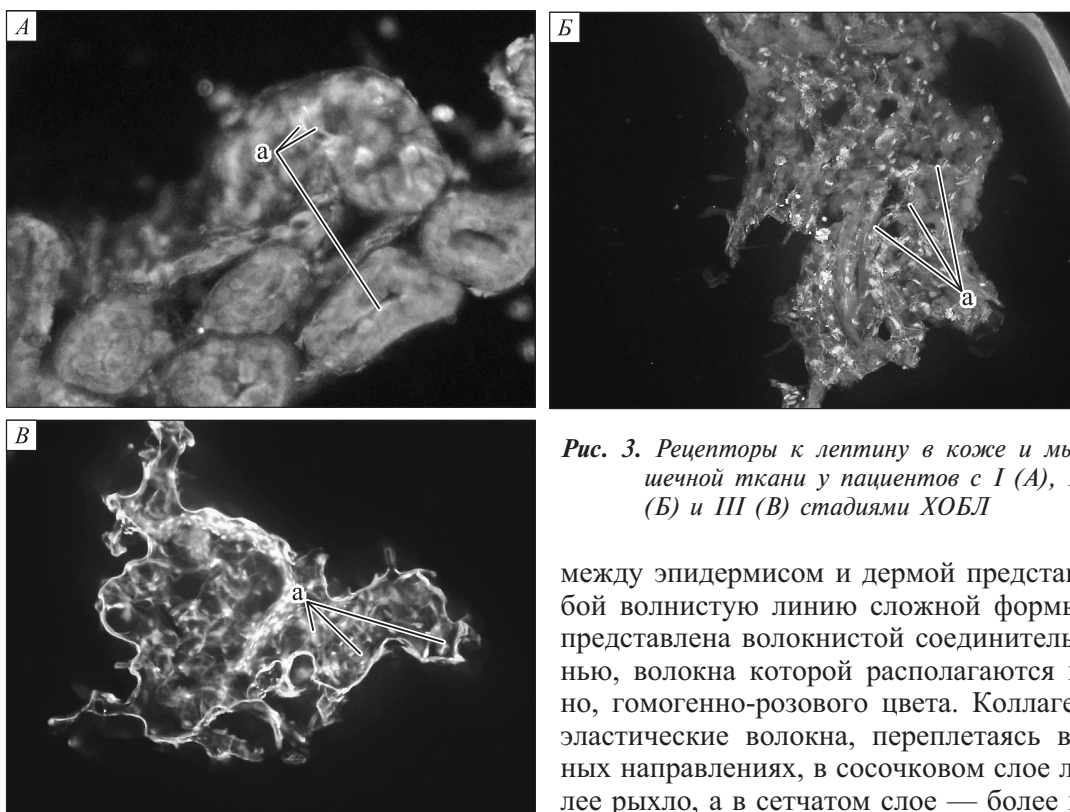


Рис. 3. Рецепторы к лептину в коже и мышечной ткани у пациентов с I (А), II (Б) и III (В) стадиями ХОБЛ

тов при III стадии заболевания ($p < 0,05$) и становясь ниже, чем у пациентов с I и II стадией ХОБЛ ($p < 0,05$). При этом, в отличие от ИМТ, находящегося в пределах референсного интервала для здоровых лиц ($18,5\text{--}25 \text{ кг/м}^2$) при всех стадиях ХОБЛ, ТМТ при III стадии заболевания не достигает порога рекомендованных значений и становится ниже 70 %.

Таким образом, более значимым показателем оценки питательной недостаточности при ХОБЛ является изменение ТМТ.

Согласно проведенному корреляционному анализу установлена прямая умеренная связь между ТМТ и ОФВ1, основным спирометрическим показателем стадии ХОБЛ ($r = 0,40; p < 0,001$). Так как с уменьшением величины ОФВ1 стадия ХОБЛ увеличивается, можно сделать вывод, что прогрессирование заболевания влияет на показатель ТМТ, который, соответственно, снижается. Для уточнения степени питательной недостаточности и исследования локализации рецепторов к адипокинам проведена оценка полученного биологического материала (рис. 1).

Во всех исследованных образцах тканей кожи, подкожной жировой клетчатки и поперечнополосатой мускулатуры признаков патологических изменений не обнаружено. В эпидермисе хорошо различимы пять слоев клеток, в каждом из которых кератиноциты находятся в различной стадии дифференцировки. Граница

между эпидермисом и дермой представляет собой волнистую линию сложной формы. Дерма представлена волокнистой соединительной тканью, волокна которой располагаются компактно, гомогенно-розового цвета. Коллагеновые и эластические волокна, переплетаясь в различных направлениях, в сосочковом слое лежат более рыхло, а в сетчатом слое — более компактными пучками, толще и грубее. Среди соединительнотканых волокон сетчатого слоя сосуды в форме «штрихов» в массе своей без содержимого. Вокруг капилляров сосудов то более тонкие, то более толстые соединительнотканые волокна образуют непосредственно около эндотелия окаймляющую капилляр муфту. Сальные железы единичные, обычного гистологического строения — в секреторных отделах сальных желез железистые клетки расположены в несколько слоев. Мышечные волокна в виде разрозненно лежащих волокон с гомогенной розовой цитоплазмой и эксцентрично расположенными ядрами.

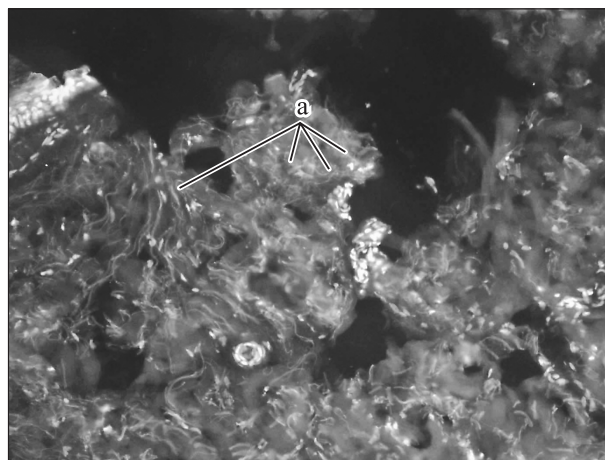


Рис. 4. Рецепторы к адипонектину типа 1 в коже и мышечной ткани группы контроля

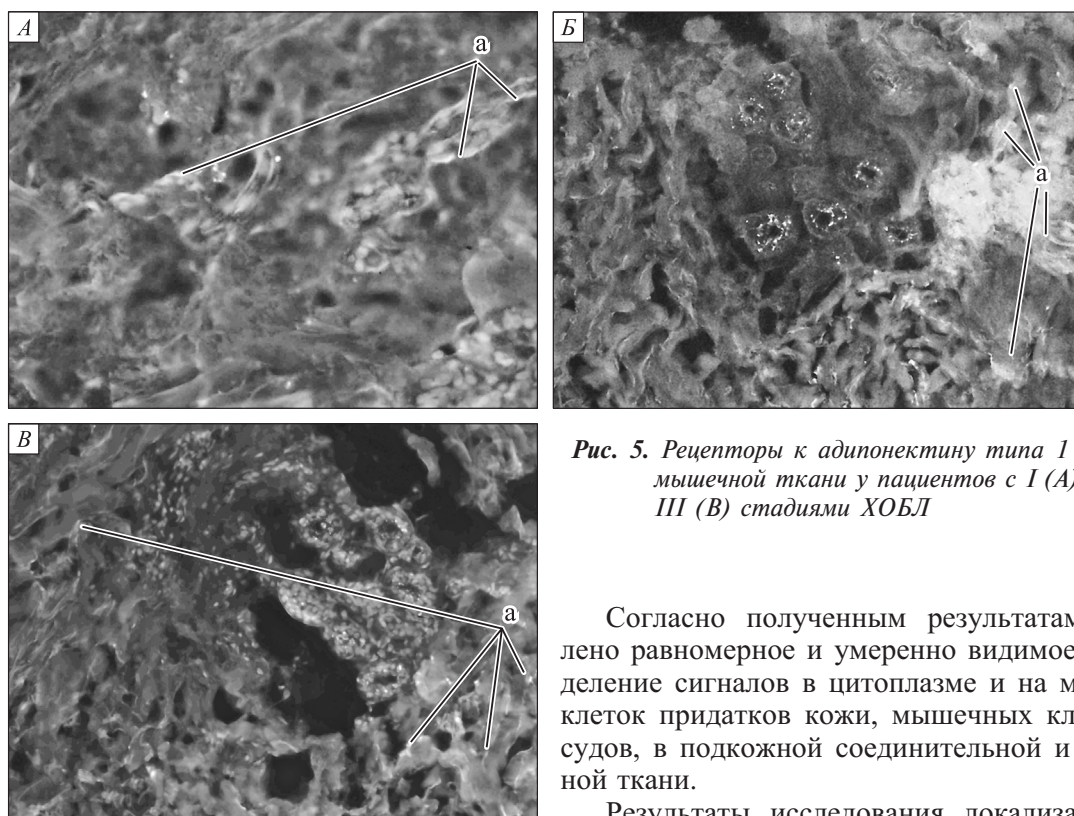


Рис. 5. Рецепторы к адипонектину типа 1 в коже и мышечной ткани у пациентов с I (А), II (Б) и III (В) стадиями ХОБЛ

Результаты иммуноцитохимического исследования локализации рецепторов в коже, соединительной и мышечной ткани к лептину здоровых людей представлены на рис. 2.

В тканях пациентов контрольной группы положительная иммуноцитохимическая реакция обнаруживается в цитоплазме и на мембране клеток сальных и потовых желез, соединительной и мышечной ткани. У здоровых людей получено большое количество сигналов, что свидетельствует о высоком уровне экспрессии гормона лептина.

Результаты исследования рецепторной активности клеток к лептину в коже и мышечной ткани у пациентов с I, II и III стадиями ХОБЛ представлены на рис. 3.

В биоптатах наблюдается положительная экспрессия антител к лептину в клетках кожи и соединительной ткани. Для клеток мышечной ткани, вне зависимости от стадии заболевания, характерно исчезновение иммунопозитивной окраски. В структурах кожи и подкожной соединительной ткани отмечено уменьшение количества сигналов по мере увеличения стадии ХОБЛ, что свидетельствует о снижении экспрессии гормона. У здоровых пациентов рецепторы к адипонектину регистрируются в мышечной ткани, коже и соединительной ткани (рис. 4).

Согласно полученным результатам, выявлено равномерное и умеренно видимое распределение сигналов в цитоплазме и на мембране клеток придатков кожи, мышечных клеток сосудов, в подкожной соединительной и мышечной ткани.

Результаты исследования локализации рецепторов к адипонектину типа 1 в коже и мышечной ткани у пациентов с I, II и III стадиями ХОБЛ представлены на рис. 5.

В отличие от рецепторной активности клеток к лептину, количество сигналов к рецепторам к адипонектину увеличивается по мере возрастания стадии ХОБЛ. Очевидно, что при ХОБЛ повышается экспрессия гормона в коже и в мышечной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Для ХОБЛ характерно развитие питательной недостаточности, фенотипическим проявлением которой является потеря мышечной массы тела даже при нормальном индексе массы тела. Потеря тощей массы тела, мышечного компонента организма, наблюдается при I стадии ХОБЛ и нарастает к III стадии заболевания.

2. У здоровых лиц присутствуют сигналы к адипокинам в коже, подкожно-жировой клетчатке и поперечнополосатой мускулатуре.

3. Для ХОБЛ характерен дисбаланс в локализации рецепторов к лептину в виде уменьшения сигналов в коже, подкожной жировой клетчатке и их исчезновения в мышечной ткани, зависящий от стадии заболевания и наиболее выраженный при III стадии ХОБЛ.

4. Для ХОБЛ характерно повышение рецепторной активности клеток к адипокину в коже и поперечнополосатой мускулатуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеев С.Н. Хроническая обструктивная болезнь легких как системное заболевание // Пульмонология. 2007. (2). 27–30.
Avdeev S.N. Chronic obstructive pulmonary disease as the systemic disease // Pulmologiya. 2007. (2). 27–30.
2. Невзорова В.А., Бархатова Д.А. Системное воспаление и состояние скелетной мускулатуры больных ХОБЛ // Тер. архив. 2008. (80). 85–90.
Nevzorova V.A., Barkhatova D.A. Systemic inflammation and state of the skeleton musculature of patients under chronic obstructive pulmonary disease // Ter. arkhiv. 2008. (80). 85–90.
3. Невзорова В.А., Бархатова Д.А. Содержание адипокинов (лептина и адипонектина) в сыворотке крови при различном состоянии питательного статуса пациентов ХОБЛ // Сб. тр. XVIII Нац. конгр. по болезням органов дыхания. Екатеринбург, 2008. 284–286.
Nevzorova V.A., Barkhatova D.A. Content of adipokines (leptin and adiponectin) in blood serum in different state of nutrient status of patients under chronic obstructive pulmonary disease // Collected papers of XVIII National congress concerning respiratory apparatus diseases. Ekaterinburg, 2008. 284–286.
4. Невзорова В.А., Бархатова Д.А., Пестрикова Т.Л. и др. Особенности течения обострения ХОБЛ в зависимости от характера возбудителя и активности системного воспаления // Бюл. физиологии и патологии дыхания. 2006. (23). 25–30.
Nevzorova V.A., Barkhatova D.A., Pestrikova T.L. et al. The course of COPD exacerbations, depending on the nature of the pathogen and the activity of systemic inflammation // Byul. fiziologii i patologii dykhaniya. 2006. (23). 25–30.
5. Рудмен Д. Оценка состояния питания // Внутренние болезни. М.: Медицина, 1993. 2. 377–385.
Rudmen D. The assessment of nutrition // Internal diseases. M.: Meditsina, 1993. 2. 377–385.
6. Bernard S., LeBlanc P., Whittom F. et al. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 1998. 158. 629–634.
7. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD). Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO workshop report. Last updated 2008. www.goldcopd.org/.
8. Zhang J., Holt H., Wang C. et al. Expression of AdipoR1 *in vivo* in skeletal muscle is independently associated with measures of truncal obesity in middle-aged Caucasian men // Diabetes Care. 2005. 28. 2058–2060.

LOCALIZATION OF THE RECEPTORS TO LEPTIN AND ADIPONECTIN IN SKIN AND MUSCULAR TISSUE UNDER NUTRIENT DEFICIENCY OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE

**Yekaterina Viktorovna BURTSEVA, Vera Afanasievna NEVZOROVA,
Inessa Valerievna DYUIZEN, Evgeniy Anatolievich KOTSYURBIY**

*Vladivostok State Medical University
690002, Vladivostok, Ostryakov st., 2*

The immunocytochemical localization of leptin and adiponectin receptors in cells of skin, subcutaneous fat and muscular tissue, obtained through percutaneous thin needle biopsy of thigh of patients with chronic obstructive pulmonary disease with presentation of nutrient deficiency has been investigated. The 60 patients with chronic obstructive pulmonary disease of I, II, III stages and 20 healthy volunteers have been examined. It has been revealed that the receptors to adiponectin and leptin are presented in cells of skin, subcutaneous fat, vessels and cross-striated muscles of healthy volunteers. Contrariwise, the signals to adiponectin disappear in muscular tissue under chronic obstructive pulmonary disease, contrary to healthy target group; receptor activity to leptin significantly increases, and to adiponectin significantly decreases in other thigh tissues ($p < 0.005$). The imbalance in localization of receptors to adiponectins can be the indication of their participation in the development of nutrient deficiency under chronic obstructive pulmonary disease.

Key words: chronic obstructive pulmonary disease, nutrient deficiency, receptors to leptin and adiponectin, muscular tissue, skin.

Burtseva Ye.V. – postgraduate student, e-mail:katriness@list.ru

Nevzorova V.A. – doctor of medical sciences, professor, head of therapy department

Dyuzhen I.V. – doctor of medical sciences, head of Central research laboratory

Kotsyurbiy E.A. – candidate of medical sciences, assistant professor of pathologic anatomy department