

biopsies) disclosed normal results in 114 (38.0 %) subjects, A in 91 cases (30.3 %) and AC in 95 (31.7 %) patients. For the combined A + AC endpoint, the HS test had SE of 58.3 % and SP of 96.5 % (AUC = 0.774), while the CV test had 97.2 % SE and 85.8 % SP (AUC = 0.916) ($p = 0.0001$). For the A endpoint, the difference between HS and CV was even more significant, AUC = 0.637 and AUC = 0.898, respectively ($p = 0.0001$). For

the AC endpoint, the HS test had SE of 85.3 % and SP of 96.5 % (AUC = 0.909), while the CV test had 100.0 % SE and 85.1 % SP (AUC = 0.925) ($p = 0.0001$). The ColonView test can be represented as a rapid test in the screening programme for colorectal cancer.

Keywords: colorectal neoplasia screening, immunochemical test, the guaiac test.

© Коллектив авторов, 2015 г.
УДК [577.23:616-005]:575.17

**Е. С. Алексеевская, А. А. Жлоба,
Т. Ф. Субботина, Н. Д. Гаврилюк,
Т. А. Дружкова, Е. В. Жидулева,
О. Б. Иртюга, О. М. Моисеева**

БЕЛКОВЫЕ МАРКЕРЫ ОБНОВЛЕНИЯ И ГИБЕЛИ МИТОХОНДРИЙ У ПАЦИЕНТОВ С НАРУШЕНИЕМ КРОВО- ОБРАЩЕНИЯ

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова; Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным представлениям, митохондриальная дисфункция (МД), с одной стороны, нарастает в ходе хронического патологического процесса, вероятно, обуславливая возрастассоциированное нарушение функций органов и организма в целом [2, 9, 16], с другой стороны, многочисленные данные указывают на связь повреждения митохондрий и развития синдрома мультиорганной дисфункции, зачастую приводящего к летальному исходу, на фоне острой патологии или травмы [11, 17]. Обсуждение возможности новых терапевтических подходов, направленных не только на коррекцию повреждения митохондрий, но и на стимуляцию их биогенеза [11], а также появление энерготропных и митохондриально-адресованных [16] лекарственных препаратов стимулируют развитие диагностических методик оценки МД. Существующие в настоящее время биохимические тесты (лактат, пируват, спектр аминокислот, органические кислоты) для оценки функционирования митохондрий не являются достаточно специфичными маркерами собственно МД. Белковые маркеры, особенно с небольшим периодом полужизни, присутствующие в системном кровотоке и непосредственно связанные с функционированием митохонд-

рий, могут быть более близки к понятию «идеального биомаркера» в плане специфичности в сравнении с метаболомными показателями.

Уровень цитохрома С (CytC) в системном кровотоке обсуждается как показатель повреждения митохондрий и гибели клеток [14]. Новые данные об экстрануклеарной локализации PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator-1 α ; 1 α -коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом) — ключевого фактора регуляции энергетического обмена и функции митохондрий — позволяют предположить наличие транспортных систем для данного белка и в цитоплазматической мембране, а также возможность его экзоцитоза [3, 5]. Изменение экспрессии гена PGC1 α обнаружено при ряде заболеваний, в том числе нейродегенеративных, сахарном диабете и сердечной недостаточности, а также в ходе старения [4, 7, 8].

Данная работа посвящена изучению содержания CytC и PGC1 α в системном кровотоке у пациентов с нарушением кровообращения на фоне патологии выходного тракта левого желудочка и их связи с известными метаболическими маркерами МД.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пациенты. Были исследованы образцы плазмы крови от 110 пациентов (71 мужчина и 39 женщин) с распределением по возрасту 61,0 (55,0 — 64,0) года. 94 пациента имели патологию выходного тракта левого желудочка: аневризму восходящего отдела аорты ($n = 69$) и аортальный стеноз ($n = 25$) (рис. 1). В качестве подгруппы без патологии выходного тракта левого желудочка были обследованы пациенты с ишемической болезнью сердца (ИБС) и другими распространенными сердечно-сосудистыми факторами риска: артериальная гипертензия, дислипидемия, ожирение, сахарный диабет ($n = 16$). Функция почек у всех пациентов была сохранной. Результаты рутинных лабораторных тестов и клиническая характеристика пациентов получены ретроспективно.

В качестве группы сравнения исследованы образцы от 34 здоровых лиц (6 мужчин и 28 женщин) в возрасте от 18 до 25 лет. Критериями включения

в группы сравнения были удовлетворительное самочувствие, отсутствие хронических заболеваний и острых воспалительных процессов по результатам анкетирования. Во всех случаях имелось информированное согласие на анонимное использование полученных в результате исследования данных. В случае с определением концентрации CytC для исключения влияния физиологического апоптоза в ходе менструального цикла у молодых женщин [10] для сравнения использовались результаты только регулярных доноров крови в возрасте от 55 до 61 года ($n = 20$, 10 мужчин и 10 женщин).

Определение белков и метаболитов. Содержание белков в плазме определяли с помощью коммерческих иммуноферментных наборов: PGC1a (*Uscn Life Science Inc.*, КНР), CytC (*Bender Med-Systems GmbH*, Австрия). Чувствительность определения PGC1a в плазме крови по данным производителя составляла не менее 61 нг/л. Для CytC предел аналитического использования набора составил 50 нг/л.

Концентрацию молочной кислоты (МК) в плазме крови определяли колориметрически с помощью лактатоксидазного теста по набору «Витал Девелопмент Корпорэйшн» (Россия).

Концентрацию пировиноградной кислоты (ПВК) определяли в безбелковом ультрафильтрате плазмы энзиматическим методом с использованием лактатдегидрогеназы. Ультрафильтрация препаратов плазмы была проведена в соответствии с рекомендациями производителя и ранее описанной модификацией [1].

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ «SAS 9.3». Степень соответствия закона распределения данных нормальному распределению оценивали с помощью критериев Шапиро-Вилко и Колмогорова — Смирнова. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха ($Me(Q1 - Q3)$). Для статистической оценки использовали непараметрические критерии. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрация МК, но не ПВК, у пациентов была выше, чем в группе сравнения ($p < 0,0001$; рис. 1), как и соотношение МК/ПВК — 20 (16–27) и 12 (8–18) соответственно ($p = 0,014$).

Существенные сдвиги у пациентов отмечены при рассмотрении белковых маркеров. В группе пациентов в целом ($n = 110$) относительно здоровых лиц обнаружено повышение концентрации PGC1a почти в два раза ($p < 0,0001$; рис. 2). В большинстве образцов крови (70 %) в группе сравнения уровень PGC1a был ниже 61 нг/л, в то время как в плазме крови пациентов значения концентрации белка выходили за уровень ниже 61 нг/л лишь в 30 % наблюдений ($\chi^2 = 13,21$; $p = 0,0003$). Группа здоровых лиц характеризовалась не только низким уровнем PGC1a, но и небольшим разбросом значений концентрации данного белка ($CV \% = 13,5$) в сравнении с пациентами, у которых концентрация PGC1a

колебалась в больших пределах — $CV \% = 60,0$. Различий в уровне данного белка в зависимости от диагноза между подгруппами не выявлено.

У пациентов ($n = 15$) с уровнем МК выше верхней границы референтного интервала (2,2 мМ), имевших различный генез нарушений кровообращения, наблюдался низкий уровень PGC1a, составивший 61,0 (61,0–142,7) нг/л. Этот уровень был достоверно ниже ($p = 0,035$), чем у остальной части пациентов — 112,5 (65,9–161,9) нг/л — и не отличался от концентрации этого белка в когорте здоровых лиц ($p > 0,05$). У лиц ($n = 14$) с уровнем ПВК выше верхней границы референтного интервала (100 мкМ) относительно всех остальных пациентов также обнаружено снижение ($p = 0,0048$) уровня PGC1a — 61,0 (61,0–81,4) и 116,6 (80,9–159,2) нг/л соответственно.

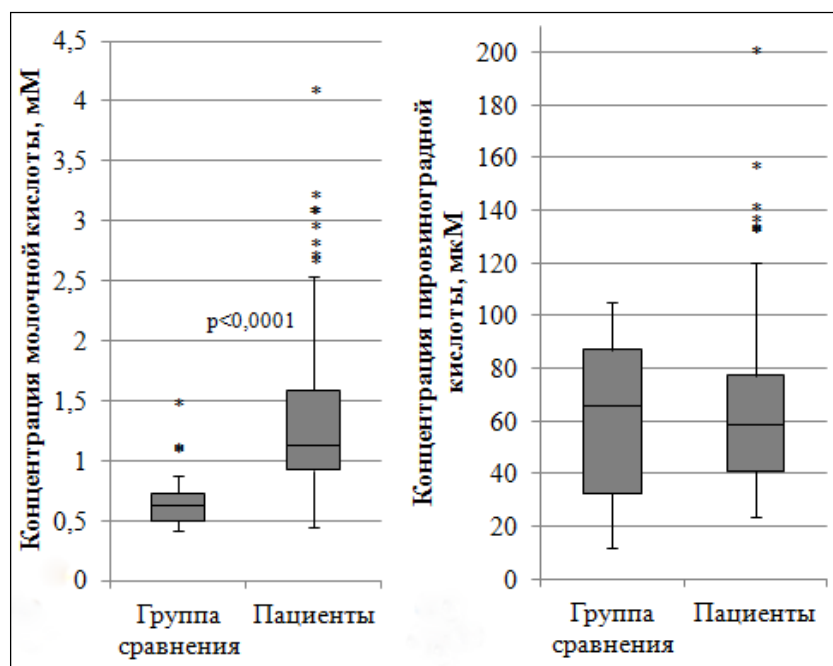


Рис. 1. Концентрации молочной и пировиноградной кислот в исследуемых группах

Концентрация CytC была выше 50 нг/л у 19 пациентов из 110 (17 %) и составила 500 (170–670) нг/л. В группе сравнения (здоровые лица в возрасте от 55 до 61 года) этот процент оказался ниже — только у 1 из 20 (5 %) лиц концентрация белка была 160 нг/л. Среди данных 19 пациентов 12 были с аневризмой аорты, 3 — с аортальным стенозом и четыре пациента без патологии аорты. Относительно молодых здоровых лиц эти пациенты также характеризовались существенным повышением уровней МК ($p < 0,0001$) и соотношения МК/ПВК ($p = 0,0045$): 1,14 (1,03–1,42) мМ и 23 (16–26) соответственно. При этом концентрация PGC1a у лиц с высоким уровнем CytC имела тенденцию к снижению (71,0 (61,0–126,2) и 118,0 (65,9–161,9) нг/л соответственно; $p = 0,095$). Во всей группе пациентов уровень CytC выше 50 нг/л достоверно чаще встречался среди лиц с низким PGC1a (38 %) в сравнении с пациентами с превышением концентрации PGC1a уровня в 61 нг/л (16 %; $\chi^2 = 4,61$; $p = 0,032$).

Таким образом, у основной части пациентов обнаружена активация синтеза и выделения в общий кровоток PGC1a, однако по мере прогрессирования процесса с развитием лактоацидоза и пируватацидемии концентрация PGC1a в крови снижалась. Повышение концентрации PGC1a в плазме крови пациентов, вероятно, может быть связано с активацией его синтеза в тканях, либо с повышением его потери клетками. Повышения уровня неспецифических маркеров клеточной проницаемости (аланин-, аспартатаминотрансферазы и общей креатинкиназы) у пациентов не выявлено, а также отсутствовала корреляционная связь между этими показателями и концентрацией исследованных белков. Следовательно, повышение концентрации PGC1a в периферической крови, вероятно, не связано с нарушением проницаемости клеточных мембран, а объясняется более сложным механизмом экзцитоза.

В экспериментах на мышах показано, что хроническое повышение уровня молочной кислоты в тканях сопровождается снижением экспрессии гена PGC1a и нарушением биогенеза митохондрий [13]. Поэтому нельзя исключить значительное прямое влияние тканевого ацидоза на биосинтез и процессинг PGC1a и других белков. Принимая во внимание короткое время существования PGC1a в клетке (менее 2 часов) [15], его концентрация в крови может отражать изменение экспрессии гена и синтеза самого белка в клетке. В свою очередь, повышение концентрации CytC в крови отражает его высвобождение из митохондрий в цитоплазму клеток. Роль увеличения содержания PGC1a в крови при отсутствии лактоацидоза в механизме регуляции обновления митохондриона на органном уровне требует дальнейшего изучения. У пациентов с умеренной лактоацидемией повышенное содержа-

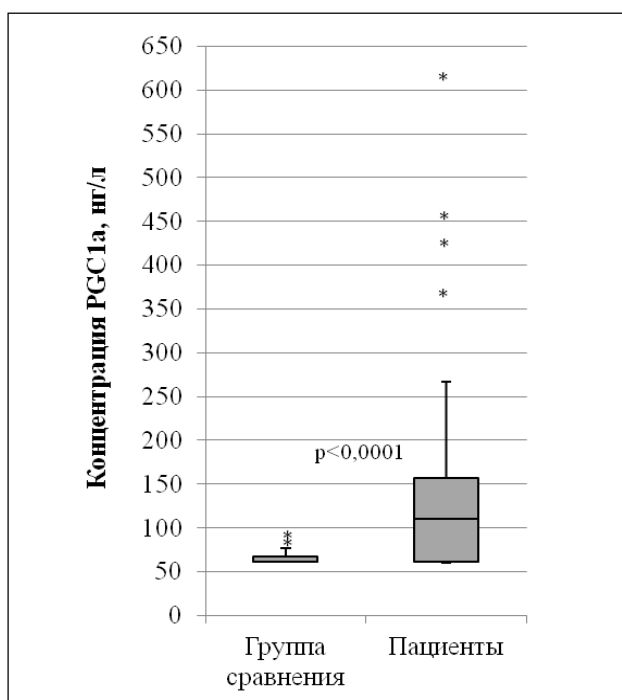


Рис. 2. Концентрация белка PGC1a в крови пациентов и здоровых лиц

ние PGC1a в крови может характеризовать стадию стимуляции образования так называемых гигантских митохондрий [12], образующихся в мышечных тканях, в том числе, при старении организма [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Промежуточная лактоацидемия и повышение уровня ПВК в крови могут сопровождаться значительным увеличением концентрации PGC1a в крови. В условиях лактоацидоза или выхода в кровоток CytC наблюдается снижение уровней PGC1a. Использование общепринятых метаболических показателей нарушения функции митохондрий, дополненное определением уровней CytC и PGC1a в крови, позволяет более полно оценить развитие МД у больных с нарушениями кровообращения различного генеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеевская Е. С., Жлоба А. А., Субботина Т. Ф. Ультрафильтрация в преаналитической стадии при определении концентрации молочной кислоты в плазме крови // Клини. лаборатор. диагностика. — 2013. — № 11. — С. 27–31.
2. Жлоба А. А., Маевская Е. Г. Дисфункция анаплеротического пути энергетического метаболизма от аминокислот к сукцинату у лиц старшей возрастной группы // Артериальная гипертензия. — 2011. — № 1. — С. 74–78.
3. Aquilano K., Vigilanza P., Baldelli S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis // J. Biol. Chem. — 2010. — № 28. — P. 21590–21599.

4. Austin S., St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism: emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders // J. Cell Sci. — 2012. — Vol. 125 (Pt 21). — P. 4963–4971.
5. Chang J. S., Huypens P., Zhang Y. et al. Regulation of NT-PGC-1 α subcellular localization and function by protein kinase A-dependent modulation of nuclear export by CRM1 // J. Biol. Chem. — 2010. — № 23. — P. 18039–18050.
6. Coleman R., Silberman M., Gershon D. et al. Giant mitochondria in the myocardium of aging and endurance-trained mice // Gerontology. — 1987. — № 1. — P. 34–39.
7. Dillon L. M., Rebelo A. P., Moraes C. T. The role of PGC-1 coactivators in aging skeletal muscle and heart // IUBMB Life. — 2012. — № 3. — P. 231–241.
8. Finck B. N., Kelly D. P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease // J. Clin. Invest. — 2006. — № 3. — P. 615–622.
9. Horan M. P., Pichaud N., Ballard J. W. Review: quantifying mitochondrial dysfunction in complex diseases of aging // J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. — 2012. — № 10. — P. 1022–1035.
10. Kokawa K., Shikone T., Nakano R. Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle // J. Clin. Endocrinol. Metab. — 1996. — № 11. — P. 4144–4147.
11. Kozlov A. V., Bahrami S., Calzia E. et al. Mitochondrial dysfunction and biogenesis: do ICU patients die from mitochondrial failure? // Annals of Intensive Care. — 2011. — № 1. — P. e41.
12. Liesa M., Palacin M., Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease // Physiol. Rev. — 2009. — № 3. — P. 799–845.
13. Ogasawara E., Nakada K., Hayashi J. Lactic acidemia in the pathogenesis of mice carrying mitochondrial DNA with a deletion // Hum. Mol. Genet. — 2010. — № 16. — P. 3179–3189.
14. Radhakrishnan J., Wang S., Ayoub I. M. et al. Circulating levels of cytochrome c after resuscitation from cardiac arrest: a marker of mitochondrial injury and predictor of survival // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2007. — № 2. — P. H767–H775.
15. Sano M., Tokudome S., Shimizu N. et al. Intramolecular control of protein stability, subnuclear compartmentalization, and coactivator function of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α // J. Biol. Chem. — 2007. — № 35. — P. 25970–25980.
16. Skulachev V. P. What is «phenoptosis» and how to fight it? // Biochemistry (Moscow). — 2012. — № 7. — P. 689–706.
17. Zorov D. B., Plotnikov E. Y., Jankauskas S. S. et al. The Phenoptosis problem: what is causing the death of an organism? Lessons from acute kidney injury // Biochemistry (Moscow). — 2012. — № 7. — P. 742–753.

РЕЗЮМЕ

Е. С. Алексеевская, А. А. Жлоба, Т. Ф. Субботина, Н. Д. Гаврилюк, Т. А. Дружкова, Е. В. Жидулева, О. Б. Иртыга, О. М. Моисеева

Белковые маркеры обновления и гибели митохондрий у пациентов с нарушением кровообращения

У пациентов с патологией выходного тракта левого желудочка в условиях развивающейся лактоацидемии обнаружен выход в кровоток цитохрома С и повышение в крови концентрации белка PGC1 α (1 α -коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом), регулирующего биогенез митохондрий.

Ключевые слова: PGC1 α , цитохром С, молочная кислота, пировиноградная кислота, диагностика митохондриальной дисфункции.

SUMMARY

E. S. Alekseevskaya, A. A. Zhloba, T. F. Subbotina, N. D. Gavriluk, T. A. Druzhkova, E. V. Zhiduleva, O. B. Irtyuga, O. M. Moiseeva

Protein markers of mitochondria formation and alteration in patients with impaired blood circulation

Patients with abnormal left ventricular outflow tract had middle lactic acidemia with detected cytochrome C release into the bloodstream and liberation of protein PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α) with elevation its blood concentration reflecting mitochondrial biogenesis in tissues.

Keywords: PGC1 α , cytochrome C, lactic acid, pyruvic acid, diagnostics of mitochondrial dysfunction.

© Коллектив авторов, 2015 г.
УДК 577.112.3:612.1

Т. Ф. Субботина, А. А. Жлоба,
Е. С. Алексеевская, И. В. Бируля

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ АМИНОКИСЛОТНОГО ПРОФИЛЯ ПЛАЗМЫ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМАРКЕРНОГО ПОДХОДА

Отдел биохимии НИЦ Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова

Одним из перспективных направлений развития персонализированной медицины является метабо-

лическое профилирование — одновременный анализ большого числа метаболитов, концентрации и соотношения которых содержат много информации об индивидуальных особенностях метаболизма, что делает возможными раннюю диагностику и целенаправленную коррекцию. Однако подходы к интерпретации метаболических профилей довольно затруднительны и недостаточно разработаны именно в связи с многочисленностью потенциальных маркеров и обилием влияющих факторов [9]. Вариантом метаболического профилирования является определение аминокислотного спектра плазмы крови, что применяется в диагностике широкого круга заболеваний. В ряде работ показано, что изменения аминокислотного профиля при сердечно-сосудистых заболеваниях проявляются на ранних стадиях и могут иметь прогностическое значение [4, 6].