

УДК 616.1:616.153.96

©Коллектив авторов

УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО PGC1 α ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

А.А. Жлоба^{1,2}, Т.Ф. Субботина^{1,2}, Е.С. Алексеевская^{1,2}, О.М. Моисеева², Н.Д. Гаврилюк², О.Б. Иртюга²*

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, 197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8; тел.: (812)499-71-08; факс: (812)234-95-69;

эл. почта: zhloba@mail.spbnit.ru

²Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, 197341, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, 2

Впервые проведено исследование уровня белка PGC1 α (1 α -коактиватора гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом) в плазме крови. Исследованы образцы здоровых лиц (n=34) и пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями (n=110), в том числе с аневризмой аорты (n=69), с аортальным стенозом (n=25) и без патологии аорты. В группе пациентов концентрация PGC1 α была выше, чем у здоровых лиц, и имела тенденцию к снижению с возрастом. Повышенные концентрации молочной кислоты, общего гомоцистеина и асимметричного диметиларгинина в крови пациентов свидетельствовали о параллельном нарастании эндотелиальной и вторичной митохондриальной дисфункций. На фоне концентраций молочной и пировиноградной кислот выше референтных значений обнаружено снижение концентрации PGC1 α .

Ключевые слова: PGC1 α , диагностика митохондриальной дисфункции, эндотелиальная дисфункция, молочная кислота, пировиноградная кислота, плазма крови

DOI: 10.18097/PBMC20166202198

ВВЕДЕНИЕ

PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator-1-alpha; коактиватор-1-альфа гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом) – ключевой фактор регуляции энергетического обмена и функции митохондрий [1]. Первоначально PGC1 α был обнаружен в бурой жировой ткани как белок, взаимодействующий с PPAR γ и участвующий в адаптации термогенеза в ответ на холод, откуда и получило свое название всё семейство PGC-1 [2]. В настоящее время известно три представителя семейства транскрипционных коактиваторов PGC-1: PGC1 α , PGC1 β и PRC (PGC-1-related coactivator; коактиватор, родственник с PGC-1), которые присутствуют во всех тканях, но наиболее активно синтезируются в тканях с высоким уровнем потребления энергии – сердце, скелетных мышцах, почках, печени, мозге [3].

PGC1 α – внутриклеточный белок, реализующий свое действие в ядре; обнаруженные в работах последних лет экстрануклеарные варианты локализации PGC1 α свидетельствуют о существовании в клетке транспортных систем для данного белка [4, 5]. PGC1 α является ключевым фактором биогенеза и регуляции функций митохондрий [6]. Изменение экспрессии гена PGC1 α обнаружены при ряде заболеваний, в том числе нейродегенеративных, сахарном диабете и сердечной недостаточности, а также в ходе старения [1, 3, 7]. В литературе представлены данные о возникновении вторичной митохондриальной дисфункции в развитии большого числа патологических процессов [8, 9]. Нарушение утилизации энергетических субстратов митохондриями, характерное для недостаточного

снабжения тканей кислородом при развитии эндотелиальной дисфункции, приводит к изменению соотношений NAD⁺/NADH и молочной (МК) и пировиноградной кислот (ПВК) в клетке, что тормозит образование PGC1 α и биогенез митохондрий [10].

Использование протеомных маркеров для оценки развивающихся нарушений при сердечно-сосудистых заболеваниях может иметь самостоятельное диагностическое значение. Так были обнаружены в крови внеклеточные варианты белков теплового шока, имеющие сигнальную функцию [11]. Уровень цитохрома *c* в системном кровотоке рассматривается как возможный показатель повреждения митохондрий и выживаемости [12]. На фоне системной ишемии увеличение концентрации цитохрома *c* в плазме было более длительным [12]. Белковые маркеры, особенно с небольшим периодом полужизни, присутствующие в системном кровотоке и непосредственно связанные с функционированием митохондрий, могут быть более близки к понятию “идеального биомаркера” в плане специфичности в сравнении с метаболомными показателями [13]. Новые данные об экстрануклеарной локализации PGC1 α [4, 5] позволяют предположить наличие транспортных систем для данного белка и в цитоплазматической мембране, а также возможность его экзоцитоза.

Данная работа посвящена изучению содержания PGC1 α в системном кровотоке. Несмотря на установленную роль PGC1 α в регуляции биогенеза митохондрий, сведений о наличии этого белка в кровотоке при заболеваниях человека в литературе не имеется. Работа предпринята ввиду недостатка в настоящее время данных о высвобождении и закономерностях изменения концентрации PGC1 α

УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО PGC1 α ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

в крови. Можно предположить, что при патологических состояниях с нарушением кровообращения, приводящих к ацидозу и ацидемии, нарушение функций митохондрий будет вызывать нарушение образования и экзоцитоз PGC1 α .

Целью настоящей работы было оценить уровень PGC1 α в крови у пациентов с нарушением кровообращения и здоровых лиц и сопоставить полученные данные с выраженностью известных метаболических маркеров митохондриальной и эндотелиальной дисфункции.

МЕТОДИКА

Пациенты

Исследованы образцы крови от 110 пациентов (71 мужчина и 39 женщин) с распределением по возрасту 61,0 (55,0-64,0) лет (рис. 1). У 94 пациентов диагностирована патология выходного тракта левого желудочка: аневризма восходящего отдела аорты (n=69) и аортальный стеноз (n=25). Диагноз аортального стеноза и дилатации аорты верифицирован по результатам трансторакального эхокардиографического (ЭХО-КГ) исследования на аппарате Vivid 7 ("GE Medical Systems", США) согласно Европейским/Американским рекомендациям по эхокардиографии по стандартному протоколу [14]. Основным критерием отбора пациентов в исследование была пиковая скорость на аортальном клапане (V_{max}) более 3,0 м/с и расширение восходящего отдела аорты более 40 мм. В качестве подгруппы без патологии выходного тракта левого желудочка были обследованы пациенты с факторами риска: артериальная гипертензия, дислипидемия, ожирение, сахарный диабет, и ишемическая болезнь сердца (ИБС) (n=16). Большинство пациентов имели системную артериальную гипертензию (n=102). Важно отметить, что пациенты с различными нозологическими формами были сопоставимы по возрасту, стандартному лабораторному обследованию за исключением уровня

креатинина и глюкозы (таблица). Функция почек у всех пациентов была сохранена. 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 группу сравнения были удовлетворительное самочувствие, отсутствие хронических заболеваний и острых воспалительных процессов по результатам анкетирования. Артериальное давление у всех здоровых лиц на момент забора крови составляло 120/80 мм рт. ст., температура тела – 36,6°C, индекс массы тела находился в пределах от 19 до 25.

Все участники дали информированное согласие на анонимное использование полученных в результате исследования данных.

Получение плазмы крови

Материал исследования – плазма крови, взятая из кубитальной вены утром натощак в вакутейнеры с цитратом натрия в качестве антикоагулянта. В ходе работы строго выдержаны временной и температурный режимы процессирования биоматериала. Кровь объемом не менее 5 мл после взятия помещали на лёд (температура около 0°C). Процедура отделения форменных элементов крови проводили в течение не более 20 мин от момента забора крови. Кровь центрифугировали 15 мин при 580 g. Образцы плазмы до анализа хранили при температуре -80°C.

Определение PGC1 α и метаболитов

Содержание PGC1 α в плазме определяли с помощью иммуноферментного набора ("Usn Life Science Inc.", КНР). Аналитический диапазон калибровочной кривой 156-10000 нг/л. Предел аналитического использования набора – 61 нг/л. Участок последовательности PGC1 α , выступающий

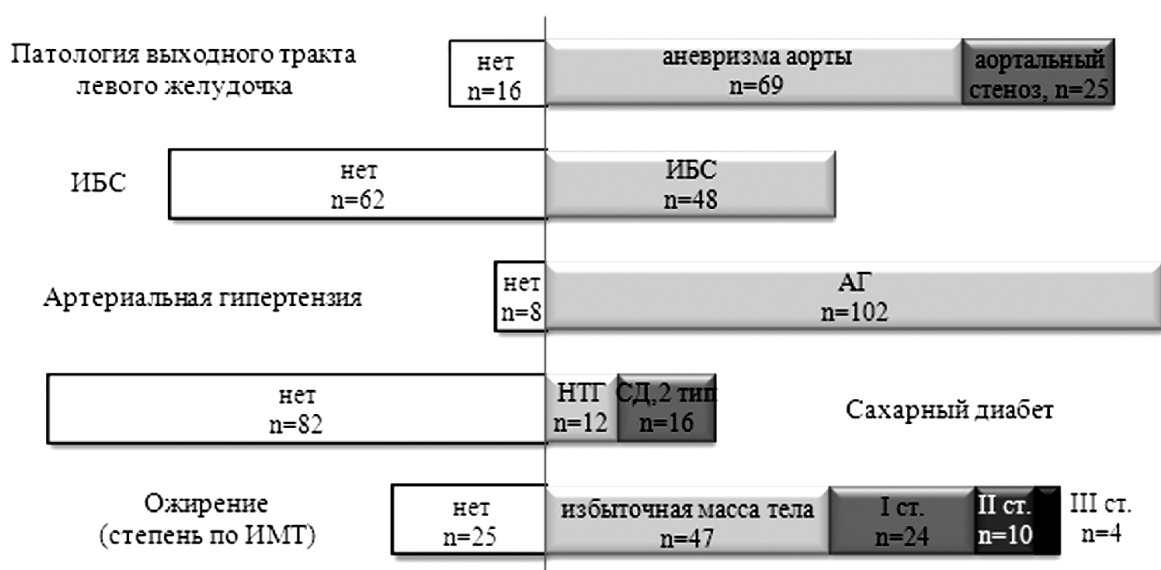


Рисунок 1. Характеристика группы пациентов, n=110. ИБС - ишемическая болезнь сердца; ИМТ - индекс массы тела; НТГ - нарушение толерантности к глюкозе.

Таблица. Характеристика подгрупп пациентов в зависимости от вида и наличия патологии выходного тракта левого желудочка.

Показатель, Ме (25-75 перцентиль)	Пациенты с аневризмой аорты	Пациенты с аортальным стенозом	Пациенты без патологии аорты
N	69	25	16
Возраст, лет	61 (55-63)	62 (57-66)	59 (53-63)
Гендерный состав, м/ж	52/17	10/15	9/7
САД, мм рт.ст.	140 (120-150)	130 (120-140)	140 (120-160)
ДАД, мм рт.ст.	80 (80-90)	80 (70-85)	80 (80-95)
ИМТ	28,8 (25,8-32,1)	26,1 (23,0-30,7)	31,0 (27,2-35,9)
Глюкоза, мМ	5,41 (4,93-5,83)*	5,59 (5,13-5,70)	6,13 (5,38-6,84)
Креатинин, мкМ	78,0 (70,0-91,0)#	68,0 (62,0-80,0)	81,5 (77,0-100,0)
Общий холестерин, мМ	4,81 (3,86-5,77)	5,30 (4,46-6,22)	5,34 (4,50-5,88)
Холестерин ЛПНП, мМ	2,85 (2,11-3,68)	3,27 (2,73-4,24)	3,07 (2,29-4,07)
Холестерин ЛПВП, мМ	1,18 (0,97-1,34)	1,22 (1,11-1,60)	1,09 (1,00-1,29)
Триацилглицериды, мМ	1,44 (0,99-1,87)	1,18 (0,95-1,73)	1,84 (1,39-2,42)
С-реактивный белок, мг/л	1,56 (0,72-3,40)	1,52 (0,67-3,03)	1,92 (1,30-3,19)
Аланинаминотрансфераза, Е/л	20,5 (18,5-23,8)	19,0 (17,8-21,8)	22,0 (18,0-30,0)
Аспаратаминотрансфераза, Е/л	21,0 (18,5-25,5)	24,0 (20,0-25,5)	20,0 (18,0-26,0)
Общая креатинкиназа, Е/л	87,0 (62,0-99,5)	68,5 (44,5-89,0)	72,5 (49,0-81,0)

Примечание: ДАД - диастолическое артериальное давление; ИМТ - индекс массы тела; ЛПВП - липопротеиды высокой плотности; ЛПНП - липопротеиды низкой плотности; САД - систолическое артериальное давление.

* - различия с подгруппой пациентов без патологии выходного тракта левого желудочка, $p=0,019$, критерий Манна-Уитни; # - различия с подгруппой пациентов с аортальным стенозом, $p=0,043$, критерий Манна-Уитни.

в качестве антигенной детерминанты при связывании с антителами, производителями не указан, но в инструкции отмечено отсутствие перекрёстной реактивности и интерференции с известными аналогами PGC1 α .

Концентрацию лактата в плазме крови определяли колориметрически с помощью лактатоксидазного теста, используя набор “Витал Девелопмент Корпорэйшн” (Россия).

Концентрацию пирувата определяли в безбелковом ультрафильтрате плазмы энзиматическим методом с использованием лактатдегидрогеназы (ЛДГ). По данным литературы, концентрация пирувата в крови у здоровых лиц может колебаться в пределах до 100 мкМ [15]. Ультрафильтрация препаратов плазмы была проведена в соответствии с рекомендациями производителя и ранее описанной модификацией [16]. Для получения безбелкового ультрафильтрата плазму крови смешивали с 0,9% NaCl в соотношении 1:4. Ультрафильтрат плазмы получали центрифугированием при 2000 g в течение 1 ч при 4°C с использованием центрифужных приспособлений вместимостью 500 мкл Vivaspin 3,000 MWCO PES (“Sartorius”, Германия). Реакционная смесь объемом 330 мкл содержала: 130 мкл ультрафильтрата, 130 мкл 50 мМ трис-HCl буфера pH 7,8, 15 мкл препарата ЛДГ (“Sigma-Aldrich”, США) с удельной активностью 50 ед./мл и 45 мкл 1 мМ NADH. Снижение оптической плотности измеряли при 340 нм. В описанных условиях оно завершалось через 10 мин после добавления препарата ЛДГ при различном содержании ПВК до полного его исчерпания в реакционной смеси. Концентрацию пирувата определяли по данным предварительно полученной калибровочной кривой

в аналитическом диапазоне от 10 мкМ до 200 мкМ пирувата натрия (“Sigma-Aldrich”). В качестве холостых проб служили реакционные смеси без добавления пирувата и препарата ЛДГ для определения вклада в оптическую плотность каждого из них.

Уровень высших оксидов азота (NO $_x$, сумма нитритов и нитратов) определяли с использованием реактива Грисса [17] в модификации изложенной ниже. В качестве восстановителя нитратов применяли рекомбинантную NADH-нитратредуктазу из *Arabidopsis thaliana* (“Sigma-Aldrich”). Лиофилизированный фермент растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 6,86 до получения раствора с активностью 1 ед./мл. 80 мкл плазмы и 20 мкл воды добавляли к 100 мкл фосфатного буфера pH 6,86, содержащего 1 мМ ЭДТА и 450 мкМ NADH. Для получения калибровочной кривой использовали метод добавок: несколько образцов плазмы анализировали в дубле с добавлением в один из образцов вместо воды 20 мкл раствора нитрата натрия с известной концентрацией (от 10 мкМ до 500 мкМ). С учётом соотношения объёмов плазмы и добавки калибровочного раствора кривая строилась в диапазоне от 2 мкМ до 100 мкМ. Полученную смесь объемом 200 мкл инкубировали с 5 мкл препарата фермента в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем избыток NADH, тормозящий реакцию Грисса, удаляли путём окисления при добавлении фермент-субстратной смеси ЛДГ-ПВК в объёме 20 мкл. Через 5 мин вносили в образцы 200 мкл 1% реактива Грисса, приготовленного на 30% уксусной кислоте. После добавления реактива Грисса интенсивность окраски измеряли при 546 нм. В качестве холостой пробы

УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО PGG1 α ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

использовали образец, в который вместо плазмы вносили 80 мкл воды. Для исключения влияния светорассеяния и поглощения за счет плазмы крови в тех же условиях инкубировали пробы с внесением объемов воды вместо ферментных препаратов (нитратредуктаза и смесь ЛДГ-пируват) в присутствии 30% уксусной кислоты вместо реактива Грисса. Из данных оптической плотности каждого образца вычитали значение поглощения холостой пробы и соответствующей пробы с уксусной кислотой.

Концентрацию общего гомоцистеина (оГци) определяли как описано ранее [18].

Концентрацию метилированных метаболитов аргинина – асимметричного диметиларгинина (АДМА) и симметричного диметиларгинина (СДМА) определяли методом ВЭЖХ после твердофазной экстракции с использованием катионообменных картриджей Oasis MCX 1 cc 30 мг (“Waters Corp.”, США) с последующей дериватизацией *орто*-фталевым альдегидом [19, 20]. Исследование уровня глюкозы, креатинина, трансаминаз и сывороточного уровня С-реактивного белка (СРБ) в периферической крови осуществляли с помощью стандартных наборов фирмы (“Roche”, США) для биохимического анализатора Cobas Integra 400 Plus (“Roche Diagnostics”, США). Определение концентраций общего холестерина и холестерина липопротеинов низкой и высокой плотности (ЛПНП, ЛПВП) и триацилглицеридов в сыворотке крови определяли с использованием стандартных наборов реактивов фирмы “Abbott Clinical Chemistry” (США).

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ SAS 9.3. Степень соответствия закона распределения данных

нормальному распределению оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилкса и Колмогорова-Смирнова. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Me(Q1-Q3)). Относительную частоту рассчитывали как отношение числа интересующих случаев к общему числу исследований в группе. Для оценки межгрупповых различий использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Анализ распределения частот проводили с помощью критерия согласия Пирсона. В случае сравнения более двух групп уровни значимости различий приведены с учётом поправки Бонферрони. Корреляционный анализ проведён с применением критерия Спирмена. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Группа обследованных пациентов в целом характеризовалась небольшими отклонениями концентраций рутинных биохимических показателей от референтных значений: глюкоза 5,5 (5,1-5,9) мМ, креатинин 77,0 (67,0-90,5) мкМ, общий холестерин 5,09 (4,06-5,82) мМ, холестерин ЛПНП 2,97 (2,16-3,89) мМ, холестерин ЛПВП 1,15 (1,00-1,35) мМ, триацилглицериды 1,50 (1,02-1,89) мМ и СРБ 1,67 (0,74-3,26) мг/л. Следует отметить, что пациенты с аортальным стенозом имели более низкий уровень креатинина ($p=0,043$), а пациенты без патологии аорты – более высокий уровень глюкозы ($p=0,019$), чем пациенты с аневризмой аорты (таблица).

Значения концентраций лактата, оГци, NOx, АДМА, СДМА ($p < 0,0001$ для всех), а также соотношение лактат/пируват ($p=0,014$) были выше в группе пациентов по сравнению со здоровыми лицами (рис. 2). Уровень оГци 5,4 (4,5-8,0) мкМ

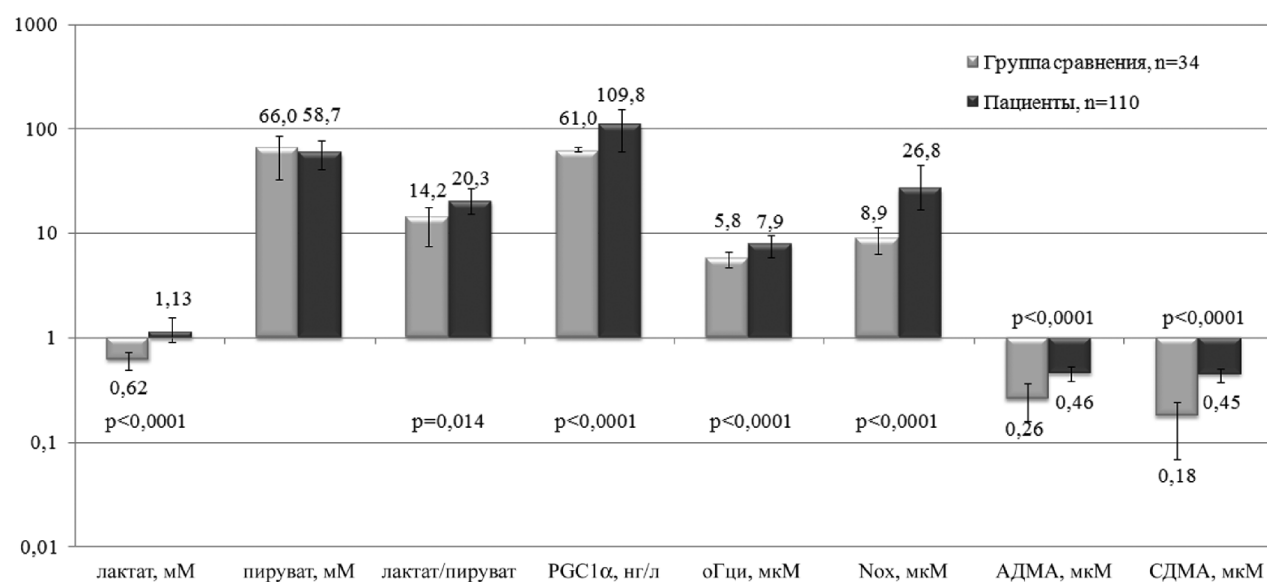


Рисунок 2. Концентрации исследованных показателей в группах здоровых лиц и пациентов. Логарифмическая шкала (десятичный логарифм); высота столбцов соответствует медиане концентраций показателей (показана цифрой), также показаны нижний и верхний квартили (в виде погрешностей). Для NOx в группе пациентов $n=30$, случайная выборка. Сравнительный анализ - критерий Манна-Уитни. АДМА - асимметричный диметиларгинин; оГци - общий гомоцистеин; СДМА - симметричный диметиларгинин; NOx - сумма нитритов и нитратов; PGG1 α - коактиватор-1-альфа гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом.

в подгруппе пациентов с аортальным стенозом был ниже ($p=0,024$), чем у пациентов с аневризмой аорты – 8,9 (7,0-10,4) мкМ. В подгруппе пациентов без патологии аорты отмечено повышение отношения лактат/пируват 27,2 (22,6-39,2) в сравнении с пациентами с аневризмой аорты 19,9 (15,7-24,5), ($p=0,0018$) и аортальным стенозом 17,2 (12,8-22,6), ($p=0,0009$). Существенного отклонения в содержании ферментов-маркеров проницаемости клетки не отмечено. Кроме того, ни в одной из подгрупп пациентов не отмечено повышения концентрации СРБ (таблица), то есть развитие митохондриальной дисфункции в группе пациентов не сопровождалось выраженным воспалительным процессом. Таким образом, при сравнении с молодыми здоровыми лицами группа пациентов характеризовалась существенными метаболическими проявлениями митохондриальной и эндотелиальной дисфункций без изменения концентрации белков-маркеров клеточной проницаемости и СРБ.

В группе пациентов обнаружено повышение концентрации PGC1 α ($p<0,0001$; рис. 2). В большинстве образцов крови (70%) в группе здоровых лиц уровень PGC1 α был ниже 61 нг/л. Из данных, представленных на рисунке 2, следует, что уровень PGC1 α в плазме крови пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями был почти в два раза выше, чем у здоровых лиц, но колебался в больших пределах, выходя ниже уровня 61 нг/л лишь в 30% наблюдений ($\chi^2=13,21$; $p=0,0003$). Группа здоровых лиц характеризовалась не только

низким уровнем PGC1 α , но и небольшим разбросом значений концентрации данного белка ($CV\%=13,5$), в сравнении с пациентами – $CV\%=60,0$. Концентрация PGC1 α у лиц с аневризмой аорты, аортальным стенозом и без патологии аорты составила 119,4 (69,6-172,2), 107,0 (61,0-142,7) и 97,4 (61,0-145,4) нг/л, соответственно. Выявленные различия не были статистически значимыми ($p>0,05$).

Повышение концентрации PGC1 α в плазме крови пациентов может быть связано либо с активацией его синтеза в тканях, либо с повышением его потери клетками. Нами не выявлено повышения уровня маркеров клеточной проницаемости, а также отсутствовала корреляционная связь между этими маркерами и концентрацией PGC1 α ($r_s=0,04$, 0,02 и 0,19 для аланин-, аспаргатаминотрансферазы и общей креатинкиназы, соответственно, $p>0,05$ во всех случаях). Это свидетельствует в пользу того, что повышение концентрации PGC1 α в периферической крови, вероятно, не связано с нарушением проницаемости клеточных мембран, а объясняется более сложным механизмом экзоцитоза.

При разделении на группы, согласно возрастной классификации ВОЗ, пациенты в возрасте 45-59 лет ($n=38$) имели более низкие значения концентраций лактата и пирувата (рис. 3А,Б), но более высокий уровень PGC1 α (рис. 3Г) в сравнении с пациентами в возрасте 60-74 года ($n=64$). Различий соотношения лактат/пируват между возрастными группами пациентов не наблюдалось (рис. 3В). Принимая во внимание короткое время существования PGC1 α

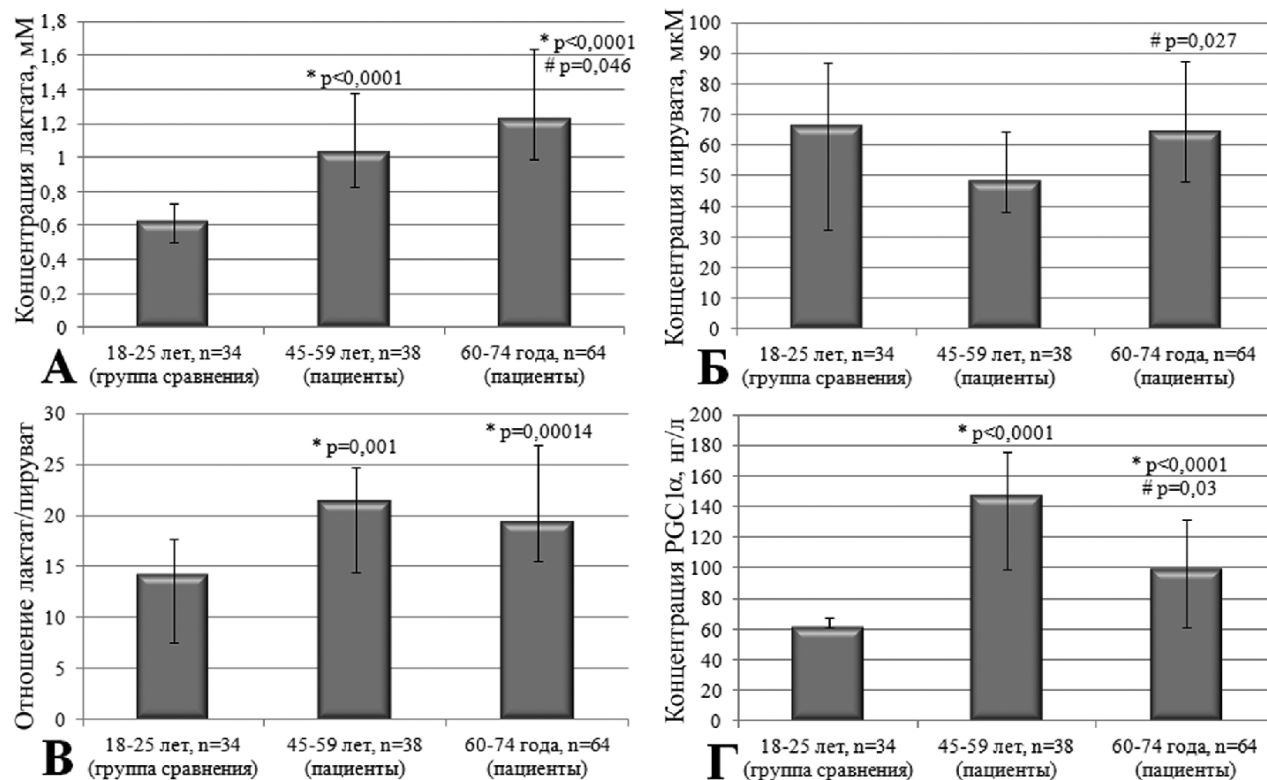


Рисунок 3. Концентрации лактата, пирувата и PGC1 α в различных возрастных группах. Высота столбцов соответствует медиане концентраций показателей, нижний и верхний квартили показаны в виде погрешностей. * - различия с группой сравнения, критерий Манна-Уитни; # - различия между возрастными группами пациентов, критерий Манна-Уитни. PGC1 α - коактиватор-1-альфа гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом.

УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО PGC1 α ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

в клетке (~2 ч) [21], возможно, что изменения его концентрации в крови отражает изменение экспрессии гена и синтеза самого белка в клетке.

При анализе всей когорты пациентов по степени повышения лактата были получены следующие результаты (рис. 4). У пациентов (n=41) с низким уровнем лактата был обнаружен повышенный уровень PGC1 α . У пациентов (n=69), имевших уровень этого метаболита выше, чем 90 перцентиль группы здоровых лиц, наблюдалось также повышение ($p<0,0001$) уровня пирувата с 41,1 (36,2-61,1) до 66,5 (50,3-98,7) мкМ (рис. 4А). Уровень PGC1 α у этих пациентов был достоверно выше, чем в группе здоровых лиц. У пациентов (n=15), с уровнем лактата выше верхней границы референтного интервала

(2,2 мМ), наблюдался низкий уровень PGC1 α , 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 приближался к уровню этого белка в когорте здоровых лиц (рис. 4Б). Таким образом, в зависимости от уровней МК выделены 3 подгруппы пациентов: 1) до 1,0 мМ (n=41); 2) от 1,0 мМ до 2,2 мМ (n=54); 3) выше 2,2 мМ (n=15). При анализе относительных частот встречаемости уровня PGC1 α выше и ниже 61 нг/л в данных подгруппах обнаружено повышение частоты встречаемости низких значений данного белка с ростом концентрации лактата – 0,17, 0,29 и 0,57 нг/л в 1, 2 и 3 подгруппах соответственно. В подгруппе 1, где уровень МК был сопоставим со значениями

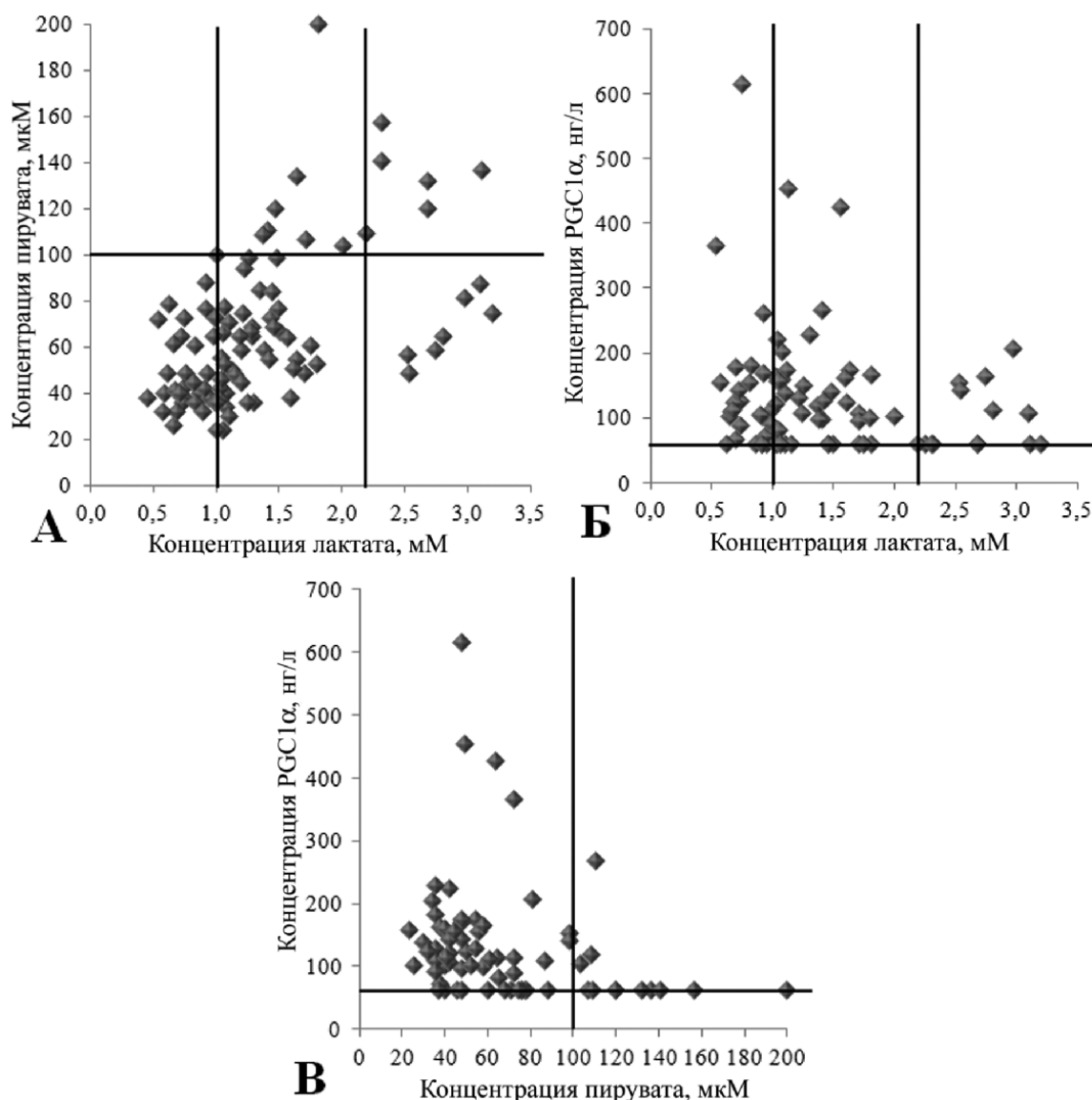


Рисунок 4. Диаграммы рассеяния концентраций лактата, пирувата и PGC1 α в группе пациентов. А. По оси абсцисс отмечены 90 перцентиль значений концентрации МК в группе сравнения (1,00 мМ), а также верхняя граница референтного интервала (2,2 мМ). По оси ординат: верхняя граница референтного интервала для пирувата (100 мкМ). Б. По оси абсцисс отмечены 90 перцентиль значений концентрации лактата в группе сравнения (1,00 мМ), а также верхняя граница референтного интервала (2,2 мМ). По оси ординат: предел аналитической использования набора при определении PGC1 α (61 нг/л). В. По оси абсцисс отмечена верхняя граница референтного интервала для ПВК (100 мкМ). По оси ординат: предел аналитической использования набора при определении PGC1 α (61 нг/л). PGC1 α - коактиватор-1-альфа гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом.

в группе здоровых лиц, в число пациентов с низкой концентрацией PGC1 α вошло всего 7 человек. У них отсутствовал сахарный диабет и отмечен 1 случай ИБС, что приближает этих пациентов по данным показателям к группе здоровых лиц. В подгруппе 3 пациентов с лактоацидезией обнаружена частая встречаемость ИБС (8 пациентов) и сахарного диабета 2 типа (5 пациентов), высокая частота встречаемости уровня PGC1 α ниже предела детектирования (достоверно выше, чем подгруппе 1; $\chi^2=7,13$; $p=0,023$ с учётом поправки Бонферрони). Это, вероятно, связано с торможением синтеза PGC1 α в условиях ацидоза и угнетением аэробных путей утилизации субстратов в митохондриях. Что касается метаболических маркеров эндотелиальной дисфункции, то их увеличение по сравнению со здоровыми лицами было характерно для указанных подгрупп, без достоверных различий по показателям АДМА, СДМА, оГци между ними.

Пациенты ($n=15$) с уровнем пирувата выше 99,1 мкМ (90 перцентиль группы здоровых лиц) относительно всех остальных пациентов характеризовались более высокими уровнями: лактата ($p<0,0001$), глюкозы ($p=0,04$), а также триацилглицеридов ($p=0,047$). При этом обнаружено снижение ($p=0,0048$) уровня PGC1 α от 116,6 (80,9-159,2) и до 61,0 (61,0-81,4) нг/л, (рис. 4В). Корреляционный анализ выявил в группе пациентов обратную связь концентрации пирувата с уровнем PGC1 α ($r=-0,40$, $p=0,0005$).

Накопление пирувата в клетке может быть вызвано торможением активности пируватдегидрогеназного комплекса (ПДГ). Есть данные о том, что при обработке культуры миоцитов высокими концентрациями 50 мМ ПВК происходит торможение экспрессии гена PGC1 α и индуцируется биогенез митохондрий [22]. Нельзя также исключить значительное прямое влияние тканевого ацидоза на биосинтез и процессинг PGC1 α и других белков. В экспериментах на мышах показано, что хроническое повышение уровня лактата в тканях сопровождается снижением экспрессии гена PGC1 α и нарушением биогенеза митохондрий [10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

У пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, как частота выявления, так и средняя концентрация PGC1 α была выше, чем у здоровых лиц. При этом уровни других белков-индикаторов клеточной проницаемости не были изменены. Повышение уровня PGC1 α обнаружено у пациентов с нарушением кровообращения и выраженной эндотелиальной дисфункцией без лактоацидоза. Промежуточные лактоацидемии и повышение уровня ПВК кислоты в крови могут сопровождаться значительным повышением уровня PGC1 α . Повышение уровня этого белка также обнаружено у пациентов с выраженными показателями эндотелиальной дисфункции при низких значениях

лактата и пирувата. Таким образом, уровень PGC1 α в крови определяется неизученным механизмом экзоцитоза с одной стороны, и колебанием его содержания в тканях, зависящего, в том числе, от нарушения использования метаболитов в митохондриях, с другой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Finck B.N., Kelly D.P. (2006) J. Clin. Invest., **116**(3), 615-622.
2. Puigserver P., Wu Z., Park C.W., Graves R., Wright M., Spiegelman B.M. (1998) Cell., **92**, 829-839.
3. Dillon L.M., Rebelo A.P., Moraes C.T. (2012) IUBMB Life, **64**, 231-241.
4. Chang J.S., Huypens P., Zhang Y., Black C., Kralli A., Gettys T.W. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 18039-18050.
5. Aquilano K., Vigilanza P., Baldelli S., Pagliei B., Rotilio G., Ciriolo M.R. (2010) J. Biol. Chem., **285**, 21590-21599.
6. Fernandez-Marcos P.J., Auwerx J. (2011) Am. J. Clin. Nutr., **93**(4), 884S-890S.
7. Austin S., St-Pierre J. (2012) J. Cell Sci., **125**(Pt 21), 4963-4970.
8. Horan M.P., Pichaud N., Ballard J.W. (2012) J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci., **67**, 1022-1035.
9. Жлоба А.А., Маевская Е.Г. (2011) Артериальная гипертензия, **17**(1), 74-78.
10. Ogasawara E., Nakada K., Hayashi J. (2010) Hum. Mol. Genet., **19**, 3179-3189.
11. Евдонин А.Л., Медведева Н.Д. (2009) Цитология, **51**(2), 130-137.
12. Radhakrishnan J., Wang S., Ayoub I.M., Kolarova J.D., Levine R.F., Gazmuri R.J. (2007) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **292**, H767-H775.
13. Liang C., Ahmad K., Sue C.M. (2014) Biochim. Biophys. Acta, **1840**(4), 1360-1367.
14. Baumgartner H., Hung J., Bermejo J., Chambers J.B., Evangelista A., Griffin B.P., Iung B., Otto C.M., Pellikka P.A., Quiñones M. (2009) Eur. J. Echocardiogr., **10**(1), 1-25.
15. Kazmeirczak S.C. (1996) in: Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation, 3rd Ed. (Kaplan L.A., Pesce A.J., eds.) Mosby-Year Book Inc., St. Louis (MO), pp. 482-483.
16. Алексеевская Е.С., Жлоба А.А., Субботина Т.Ф. (2013) Клиническая лабораторная диагностика, №11, 27-31.
17. Sun J., Zhang X., Broderick M., Fein H. (2003) Sensors, **3**, 276-284.
18. Zhloba A.A., Blashko E.L. (2004) J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., **800**, 275-280.
19. Schwedhelm E. (2005) Vasc. Med., **10**, S89-95.
20. Гилинский М.А., Айзман Р.И., Корощенко Г.А., Латышева Т.В., Новоселова Т.И., Петракова Г.М., Суховершин П.А., Субботялов М.А. (2010) Бюллетень СО РАМН, **30**, 82-86.
21. Sano M., Tokudome S., Shimizu N., Yoshikawa N., Ogawa C., Shirakawa K., Endo J., Katayama T., Yuasa S., Ieda M., Makino S., Hattori F., Tanaka H., Fukuda K. (2007) J. Biol. Chem., **282**, 25970-25980.
22. Wilson L., Yang Q., Szustakowski J.D., Gullicksen P.S., Halse R. (2007) Am. J. Physiol. Cell Physiol., **292**, C1599-1605.

Поступила: 24. 06. 2014.
Принята к печати: 20. 10. 2014.

THE LEVEL OF CIRCULATING PGC1 α IN CARDIOVASCULAR DISEASE

A.A. Zhloba^{1,2}, T.F. Subbotina^{1,2}, E.S. Alekseevskaya^{1,2}, O.M. Moiseeva², N.D. Gavriluk², O.B. Irtyuga²

¹Pavlov First Saint Petersburg State Medical University,
6-8 L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, 197022 Russia; tel.: +7(812) 499-71-08; fax: +7(812) 234-95-69;
e-mail: zhloba@mail.spbnit.ru

²Federal Almazov Medical Research Center, 2 Akkuratova str., Saint Petersburg, 197341 Russia

The level of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha (PGC1 α) in human blood plasma was investigated. Samples of healthy individuals (n=34) and patients with cardiovascular diseases (n=110), including aortic aneurysm (n=69), aortic stenosis (n=25) and patients without aortic pathologies were analyzed. In patients the PGC1 α concentration was higher than that in healthy persons, and tended to decrease with age. Elevated concentrations of lactic acid, total homocysteine and asymmetric dimethylarginine in the blood of patients suggested a parallel development of endothelial and secondary mitochondrial dysfunction. However, concentrations of lactic and pyruvic acids exceeding reference limit were associated with the decrease in the PGC1 α level.

Key words: PGC1 α , diagnostics of mitochondrial dysfunction, endothelial dysfunction, lactic acid, pyruvic acid, blood plasma.