

На правах рукописи

АЛЕКСЕЕВСКАЯ
Елизавета Сергеевна

**ТРИМЕТИЛЛИЗИН И БЕЛОК PGC1A В КАЧЕСТВЕ
СИСТЕМНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ
У ЛИЦ С НАЧАЛЬНОЙ СТАДИЕЙ
СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ**

14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор **Жлоба Александр Анатольевич**

Официальные оппоненты:

Гуревич Виктор Савельевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства Российской Федерации, заведующий отделом атеросклероза Научно-клинического и образовательного центра «Кардиология» медицинского факультета

Дорофейков Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный государственный Университет физической культуры, спорта и здоровья имени П.Ф. Лесгафта, Санкт-Петербург» Министерства спорта Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2017 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 205.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 194044, Санкт-Петербург, ул.Академика Лебедева, д. 4/2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова» МЧС России по адресу: 197374, Санкт-Петербург, ул. Оптиков, д. 54 и на сайте: www.arcerm.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат медицинских наук

М.В. Санников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Нарушение функции митохондрий является одним из ключевых звеньев патогенеза таких патологических состояний как сердечная недостаточность [Murray A.J., 2007; Rosca M.G., 2013], атеросклероз [Madamanchi N.R., 2007], инсулинорезистентность [Kim J.A., 2008], ожирение [Bournat J.C., 2010; Boudina S., 2014], нейродегенеративные заболевания [Cabezas-Opazo F.A., 2015; Hang L., 2015] и эндотелиальная дисфункция [Davidson S.M., 2007]. Современное понимание важности роли митохондрий в здоровье и патологии человека стимулирует разработку новых подходов терапии, предусматривающих использование таргетных митохондриально-адресованных препаратов [Скулачев В.П., 2005]. Тем не менее, в практике российского здравоохранения оценке и коррекции функции митохондрий на сегодняшний день не уделяется должного внимания. Во многом низкая распространённость диагностической оценки функции митохондрий, что в свою очередь влияет и на частоту применения энерготропных лекарственных препаратов, обусловлена отсутствием широкодоступных и информативных диагностических показателей митохондриальной дисфункции, поиск которых является актуальной задачей современной клинической биохимии.

Одним из признаков митохондриальной дисфункции является нарушение утилизации энергетических субстратов, включая переключение обмена с преимущественного использования жирных кислот на окисление глюкозы [Vamesq J., 2012]. Накопление таких метаболитов как молочная и пировиноградная кислоты является признаком нарушения аэробного метаболизма глюкозы, но не позволяет сделать вывод о состоянии процесса окисления жирных кислот в митохондриях. Метилированное производное основной аминокислоты лизина – N^ε,N^ε,N^ε-триметил-L-лизин – образуется в результате протеолиза клеточных белков и является эндогенным субстратом для биосинтеза карнитина, первая реакция которого протекает в матриксе митохондрий [Vaz F.M., 2002]. Таким образом, триметиллизин может рассматриваться как один из показателей для оценки процесса утилизации энергетических субстратов в митохондриях.

На смену представлениям об автономности митохондрий, установившимся после открытия собственной митохондриальной ДНК (мтДНК), в настоящее время пришло понимание важности ядерно-митохондриального взаимодействия для функционирования митохондрия и клетки в целом. Открытый в конце XX века белок PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, 1 α -коактиватор γ -рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом) [Puigserver P., 1998] на сегодняшний день рассматривается как один из главных факторов регуляции процессов экспрессии генов митохондриальных белков с обоих геномов, а также репликации мтДНК и образования новых митохондрий. Изменение синтеза белка PGC1 α и экспрессии соответствующего гена обнаружено при различных патологических состояниях [Finck B.N., 2006; Villena J.A., 2015], что позволило рассматривать данный белок и связанные с

ним сигнальные пути в качестве новой перспективной мишени для терапевтического воздействия [Wenz T., 2009; Schilling J., 2011].

Степень разработанности темы исследования. Интенсивность процесса синтеза эндогенного карнитина лимитируется первой реакцией гидроксирования триметиллизина в митохондриях, скорость которой зависит от доступности субстрата [Rebouche C.J., 1986]. У человека не обнаружены ферменты, способные метилировать свободный Лиз, поэтому уровень триметиллизина в тканях и крови определяется соотношением процессов посттрансляционного метилирования и деметилирования белков. Важными источниками триметиллизина являются гистоны, имеющие относительно высокое содержание сайтов метилирования по Лиз [Zhang Y., 2001], и миозин [Hardy M.F., 1970], в силу большого объема мышечной ткани. Триметиллизин, образовавшийся в тканях и попавший в кровь, обратно в клетки практически не поступает [Zaspel B.J., 1980; Rebouche C.J., 1980]. Показано, что в крови уровень триметиллизина положительно коррелирует с концентрацией как свободного, так и общего карнитина [Ringseis R., 2010]. В ряде работ последних лет обнаружена связь между повышением концентрации триметиллизина и прогрессией атеросклероза [Løland K.H., 2013], а также риском летального исхода у лиц с сердечно-сосудистой патологией [Skagen K., 2016], хотя механизм этой связи до конца не ясен.

В последние годы наблюдается рост числа исследований по поиску новых специфичных системных маркеров для диагностики митохондриальной дисфункции среди циркулирующих белков, связанных с функционированием митохондрий. Для секретируемого цитокина FGF21 (fibroblast growth factor 21, фактор роста фибробластов 21), вовлеченного в регуляцию метаболизма, продемонстрированы высокие показатели специфичности и чувствительности в плане диагностики наследственных митохондриальных нарушений, превышающие таковые для метаболических маркеров – молочной и пировиноградной кислот [Suomalainen A., 2011; Davis R.L., 2013]. Тем не менее, при изучении состояний с вторичным нарушением функции митохондрий для FGF-21 не выявлено существенных изменений [Salehi M.H., 2013]. Новые данные об экстрануклеарной локализации и функции PGC1 α в клетке [Aquilano K., 2010; Lettieri Barbato D., 2012] указывают на наличие внутриклеточных транспортных систем для данного белка, а также позволяют предположить возможность его экзоцитоза. Изменение экспрессии гена PGC1 α обнаружены при ряде заболеваний, для которых характерно развитие вторичной митохондриальной дисфункции, в том числе нейродегенеративных, сахарном диабете и сердечной недостаточности, а также в ходе старения [Finck B.N., 2006; Dillon L.M., 2012; Austin S., 2012]. Таким образом, триметиллизин и белок PGC1 α в силу особенностей своего метаболизма и выполняемых функций являются перспективными кандидатами на роль новых системных маркеров для оценки митохондриальной дисфункции.

Цель исследования – оценка новых лабораторных критериев для раннего выявления митохондриальной дисфункции путем изучения уровней триметиллизина и белка PGC1 α в плазме крови лиц с начальной стадией сердечной недостаточности, а также их взаимосвязей с известными метаболическими показателями функции митохондрий.

Задачи исследования:

1. Оценить сдвиги метаболических показателей, связанных с функцией митохондрий (молочная и пировиноградная кислоты, спектр аминокислот, белок цитохром C) в плазме крови у пациентов с начальной стадией развития сердечной недостаточности.
2. Модифицировать методику определения метилированных производных аргинина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии для одновременного выявления триметиллизина в плазме крови, а также провести валидацию предлагаемой методики.
3. Оценить уровень триметиллизина в плазме крови пациентов, изучить его взаимосвязь с уровнями известных метаболических показателей митохондриальной дисфункции, а также содержанием метилированных производных аргинина.
4. Оценить содержание в плазме крови пациентов с начальной стадией сердечной недостаточности белка PGC1 α , а также изучить его взаимосвязь с уровнями известных метаболических показателей функции митохондрий.
5. На основании проведенного сравнения с другими метаболическими показателями функции митохондрий оценить диагностическое значение триметиллизина и белка PGC1 α в качестве лабораторных критериев для раннего выявления митохондриальной дисфункции.

Научная новизна исследования. Впервые комплекс метаболических показателей, включающий молочную и пировиноградную кислоты, спектр аминокислот, а также белок цитохром C, был исследован у лиц начальной стадией сердечной недостаточности. Доказано, что уже на ранней стадии развития сердечной недостаточности наблюдаются метаболические отклонения, характерные для нарушения функции митохондрий.

Впервые проведено сопоставление значений уровня триметиллизина у здоровых представителей российской популяции с референтными значениями для этой аминокислоты по данным зарубежных исследователей. Выявлено, что уровень триметиллизина в группе здоровых лиц, определенный с использованием предложенной модификации методики, совпадает с данными литературы. Впервые обнаружены разнонаправленные изменения в содержании метилированных производных лизина и аргинина в крови. У лиц с отсутствием выраженного атеросклеротического процесса в условиях развития сердечной недостаточности уровень триметиллизина, в отличие от метилированных производных аргинина, снижается.

Впервые показана возможность определения белка PGC1 α в крови. Обнаружено повышение концентрации данного белка в плазме крови у пациентов с развитием сердечной недостаточности.

Теоретическая и практическая значимость. Изучены новые теоретические аспекты метаболических нарушений на начальной стадии развития сердечной недостаточности. Полученные результаты о присутствии и вариации значений белка PGC1 α в системном кровотоке имеют академическую ценность и могут быть включены в методические пособия по клинической лабораторной диагностике для студентов и аспирантов. Данные о снижении уровня триметиллизина в крови при развитии сердечной недостаточности указывают, что нарушение обмена липидов при сердечно-сосудистой патологии может быть связано не только с нарушением их транспорта из крови в ткани, но и с дефицитом внутриклеточных транспортеров.

Показана возможность использования триметиллизина и белка PGC1 α в качестве системных маркеров для оценки митохондриальной дисфункции. Частота отклонений уровней триметиллизина и белка PGC1 α в крови у пациентов с развитием сердечной недостаточности относительно группы здоровых лиц составила 70%, что достоверно выше в сравнении с выявленной частотой для молочной и пировиноградной кислот, а также цитохрома C. Это позволяет рассматривать триметиллизин и белок PGC1 α как показатели с более высокой диагностической чувствительностью, причем уже на ранних стадиях развития патологического процесса.

Полученные результаты о присутствии белка PGC1 α в системном кровотоке имеют значение не только для диагностики митохондриальной дисфункции, но также могут быть использованы для разработки способов мониторинга терапии энергодефицитных состояний, предполагающей воздействие на биогенез митохондрий.

Предложенная модификация методики определения метилированных производных основных аминокислот позволяет получать воспроизводимые результаты, и может быть использована в области лабораторной медицины не только для диагностики митохондриальной дисфункции, но и для оценки риска развития дисфункции эндотелия, так как одновременно с триметиллизином возможно определение уровня метилированных производных аргинина.

Методология и методы исследования. Работа выполнена в дизайне сравнительного открытого исследования, и основана на результатах обследования 94 пациентов с начальными проявлениями сердечной недостаточности и 64 человек без нарушения сердечной деятельности. Комплексная оценка метаболических проявлений дисфункции митохондрий выполнена с использованием биохимических, иммуноферментного и хроматографического методов анализа. Для реализации цели и задач исследования использованы современные методы статистической обработки полученных данных.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Метаболические изменения, характеризующие нарушение функции митохондрий, наблюдаются уже на начальной стадии развития сердечной недостаточности.

2. Уровень триметиллизина в крови, в отличие от метилированных производных аргинина, характеризует функцию митохондрий. В сравнении с другими показателями митохондриальной дисфункции на начальных стадиях развития сердечной недостаточности уровень триметиллизина характеризуется более высокой частотой отклонений от значений в группе здоровых лиц, что указывает на возможность использования данного показателя для раннего выявления митохондриальной дисфункции.

3. Белок PGC1 α обнаруживается в крови человека, и уровень данного белка в плазме крови не связан с концентрацией показателей неспецифической проницаемости клеточных мембран, а также быстро обновляемых белков крови, но зависит от нарушения использования энергетических субстратов митохондриями. Частота отклонений уровня белка PGC1 α относительно здоровых лиц уже на начальной стадии развития сердечной недостаточности выше, чем для других исследованных показателей митохондриальной дисфункции.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Результаты получены современными биохимическими методами. Выводы работы и выносимые на защиту положения соответствуют полученным результатам. Достоверность выводов подтверждается корректной статистической обработкой данных.

Полученные в ходе исследования научные результаты были освещены в рамках докладов на: LXXIII научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2012», Санкт-Петербург, 2012; International conference on “Chemistry for health”, Афины, 2012; XVIII Всероссийской научно-практической конференции «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины», Москва, 2013; LXXIV научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2013», Санкт-Петербург, 2013; 38th FEBS Congress, Санкт-Петербург, 2013; V Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские чтения-2013», Санкт-Петербург, 2013; LXXV научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2014», Санкт-Петербург, 2014; 7th International Symposium on Asymmetric Dimethylarginine. ADMA 2014. Endogenous Modulators of Nitric Oxide: From Mechanisms to Medicine, Санкт-Петербург, 2014; LXXVI научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины-2015», Санкт-Петербург, 2015; 14th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Вена, 2015; VIII Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные направления биохимии человека», Санкт-Петербург, 2015; VI Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения-2015», Санкт-Петербург, 2015.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ, включая 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки

Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Личное участие автора в выполнении исследования. Все этапы диссертационной работы выполнены при непосредственном участии автора. Автор лично осуществлял планирование экспериментов и их выполнение. Диссертантом проведена статистическая обработка данных проведенного исследования, интерпретация полученных результатов с последующим формулированием выводов и практических рекомендаций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов экспериментальных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 107 страницах машинописного текста, иллюстрирована 6 таблицами и 14 рисунками. Список литературы включает 178 источников (15 на русском языке и 163 на иностранном).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Сбор клинического материала проводился с 2013 по 2014 годы на базе СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова. Протокол исследования в соответствии с принципами Хельсинкской декларации был одобрен Этическим комитетом СЗФМИЦ им. В.А. Алмазова.

Были исследованы образцы крови от 94 пациентов (61 мужчина и 33 женщины) в возрасте от 30 до 77 лет с распределением по возрасту 61 (55-64) лет. Критерием включения в исследование было наличие I либо II функционального класса (ФК) сердечной недостаточности (СН) по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA). 57 пациентов имели признаки СН соответствующие II ФК по NYHA (NYHA ФК II). Оставшиеся 37 пациентов составили подгруппу NYHA ФК I. Критериями исключения из исследования было наличие заболеваний почек, печени, а также эндокринных желез (за исключением сахарного диабета 2 типа).

Развитие СН у обследованных пациентов было обусловлено патологией выходного тракта левого желудочка сердца: аневризма восходящего отдела аорты (n=69) либо аортальный стеноз (n=25). Диагноз аортального стеноза и дилатации аорты верифицировался по результатам трансторакального эхокардиографического исследования на аппарате Vivid 7 (GE, США) согласно Европейским/Американским рекомендациям по эхокардиографии по стандартному протоколу [Baumgartner H., 2009]. Критерием постановки диагноза аортального стеноза была пиковая скорость на аортальном клапане более 4,0 м/с, аневризмы аорты – расширение восходящего отдела аорты более 45 мм. Аневризма аорты и аортальный стеноз этиологически были не связаны с атеросклерозом, инфекционными поражениями, последствиями травмы или хирургического вмешательства, а также наследственными заболеваниями соединительной ткани (синдром Марфана и др.). У части

пациентов бicuspidальный аортальный клапан был причиной патологии выходного тракта левого желудочка сердца (треть пациентов с аневризмой аорты и половина пациентов с аортальным стенозом).

В качестве группы сравнения исследованы образцы от 64 здоровых лиц (17 мужчин и 47 женщин) без признаков СН в возрасте от 18 лет до 61 года. Критериями включения в группу сравнения были удовлетворительное самочувствие, отсутствие хронических заболеваний в анамнезе, а также признаков острого воспалительного процесса.

Материал исследования – плазма крови, взятой из кубитальной вены утром натощак в вакутейнеры с цитратом натрия или ЭДТА в качестве антикоагулянтов. Кровь после взятия помещали на лед (температура около 0 °С). Процедуру отделения форменных элементов крови проводили в течение не более 20 минут от момента взятия крови. Кровь центрифугировали 15 минут при 580 g (3000 об/ мин). Образцы плазмы до анализа хранили при температуре –80 °С.

Методы исследования

Все лабораторные исследования выполнены в Отделе биохимии НИЦ ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

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 с использованием лактатдегидрогеназы.

Аминокислотный профиль плазмы определяли путем обращенно-фазного ВЭЖХ-анализа депротенинизированных образцов с использованием колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6 мм, 3,5 мкм). Осуществляли предколоночную дериватизацию ортофталевым альдегидом (OPA), а измерение флуоресценции элюата проводили при длине волны возбуждения 340 нм и испускания 455 нм, согласно рекомендациям фирмы Agilent Technologies [Bartolomeo M.P., 2006]. Концентрации аминокислот рассчитывали, используя норвалин в качестве внутреннего стандарта.

Содержание белков определяли с помощью коммерческих наборов реактивов для иммуноферментного анализа: PGC1a (Uscn Life Science Inc., КНР), цитохром C (Bender MedSystems GmbH, Австрия); инсулиноподобный фактор роста 1 (DRG Instruments GmbH, Германия); ретинолсвязывающий белок 4 (Immundiagnostik AG, Германия). Так как исследование уровня белка PGC1a в плазме крови человека было проведено впервые, для оценки влияния компонентов данной биологической матрицы на ход анализа стандартные растворы белка помимо буфера от производителя также разводили с использованием плазмы крови от здоровых лиц (spike control).

Концентрацию триметиллизина (ТМЛ) совместно с метилированными метаболитами аргинина – асимметричным (АДМА) и симметричным (СДМА) диметиларгининами определяли методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием после твердофазной экстракции с

последующей дериватизацией ОРА. В качестве прототипов использованы методики для определения АДМА [Teerlink T., 2002; Schwedhelm E., 2005; Гишинский М.А., 2010]. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта. ВЭЖХ проводили при 40 °С с использованием колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6 мм, 3,5 мкм) и 40 мМ фосфатного буфера (фаза А), рН 7,8. Градиент подвижной фазы В (ацетонитрил/метанол/вода в соотношении 45/45/10 по объему) составил от 10 до 30%. Измерение флуоресценции элюата вели при длине волны возбуждения 340 нм и испускания 455 нм. Валидация методики определения концентрации ТМЛ в плазме крови методом ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием включала оценку линейности метода, предела количественного определения (LOQ), точности и прецизионности результатов внутри одной серии и между сериями.

Результаты рутинных лабораторных тестов получены ретроспективно.

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ SAS 9.3. Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха (Me(Q1-Q3)). При оценке частоты отклонений значений исследованных показателей в группе пациентов от таковых в группе сравнения в качестве разделяющего уровня использовали 95-ый перцентиль распределения значений у здоровых лиц в случае повышения показателя у пациентов и 5-ый перцентиль в случае его снижения. Для оценки межгрупповых различий использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Анализ распределения частот проводили с помощью критерия согласия Пирсона (χ^2). В случае сравнения более двух групп уровни значимости различий приведены с учетом поправки Бонферрони. Корреляционный анализ проведен с применением критерия Спирмена. Критический уровень достоверности нулевой статистической гипотезы принимали равным 0,05.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

1. Значения стандартных биохимических показателей у обследованных пациентов. Группа пациентов в целом характеризовалась умеренными отклонениями концентраций рутинных биохимических показателей от референтных значений: глюкоза 5,5 (5,0-5,8) мМ, креатинин 76 (66-89) мкМ, общий холестерин 5,0 (4,0-5,8) мМ, холестерин ЛПНП 2,9 (2,2-3,9) мМ, холестерин ЛПВП 1,2 (1,0-1,4) мМ, ТГ 1,4 (1,0-1,9) мМ, СРБ 1,6 (0,7-3,3) мг/л, аланинаминотрансфераза (АЛТ) 20 (18-24) Е/л, аспартатаминотрансфераза (АСТ) 22 (19-26) Е/л и общая креатинфосфокиназа (КФК) 86 (54-100) Е/л. Пациенты разных ФК по NYHA были сопоставимы по возрасту и уровням показателей стандартного лабораторного обследования за исключением уровня ТГ, который был выше у пациентов с ФК II по NYHA ($p=0,022$). Также подгруппа NYHA II характеризовалась более высоким показателем ИМТ ($p=0,037$).

Таким образом, у обследованных пациентов обнаружены умеренные сдвиги концентраций стандартных биохимических показателей, в

большинстве своем не связанные со степенью нарушения сердечной деятельности.

2. Метаболические проявления митохондриальной дисфункции у пациентов с начальной стадией сердечной недостаточности

2.1. Содержание молочной и пировиноградной кислот. В группе пациентов обнаружено повышение концентрации МК (Рис. 1А), в то время как уровень ПВК между группами пациентов и здоровых лиц статистически не различался (Рис. 1Б). Значения соотношения МК/ПВК в группе пациентов также были выше – 20,3(15,6-27,1) против 11,7(7,6-17,7) в группе сравнения ($p < 0,0001$).

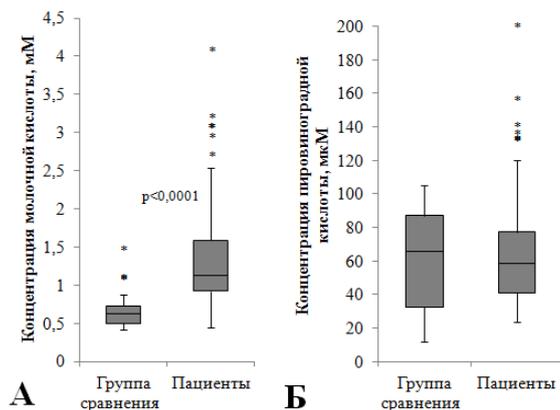


Рис. 1. Концентрации молочной (А) и пировиноградной (Б) кислот в группах здоровых лиц и пациентов

Референтный интервал для МК в плазме венозной крови согласно данным литературы составляет 0,5-2,2 мМ [Тиц Н.У., 1986; Kazmeirczak S.C.^a, 1996]. В ходе настоящей работы строго выдержаны требования преаналитического этапа при определении концентраций МК и ПВК, включая подготовку пациента к взятию материала. В результате, 95-ый перцентиль значений концентрации МК у лиц группы сравнения был значительно ниже верхней границы референтного интервала и составил 1,1 мМ. В виду полученной разницы, значения концентрации МК у пациентов в пределах от 1,1 до 2,2 мМ в настоящей работе интерпретировались как умеренное повышение уровня МК, а термин «гиперлактатемия» употреблялся в случаях, когда концентрация МК в крови превышала 2,2 мМ. Следует отметить, что в отношении ПВК диапазон значений в группе сравнения (15-104 мкМ, 5-95 перцентили) совпал с литературным референтным интервалом – до 100 мкМ [Kazmeirczak S.C.^b, 1996].

Концентрация МК превышала уровень в 1,1 мМ у половины пациентов (44 из 94, 47%). Выше 2,2 мМ уровень МК был у 10 лиц (11%), то есть у каждого десятого пациента наблюдалась гиперлактатемия. С аналогичной частотой среди пациентов встречались случаи высоких значений ПВК – 12 лиц с уровнем ПВК выше 104 мкМ.

Таким образом, даже на начальной стадии развития СН обнаруживаются метаболические признаки МД, проявляющиеся в нарастании концентрации МК и соотношения МК/ПВК в плазме крови.

2.2. Особенности аминокислотного спектра пациентов. Выборочно для части пациентов ($n=55$, 34 мужчин и 21 женщин, 61(54-65) лет) было

проведено исследование концентрации аминокислот в плазме крови. Относительно здоровых лиц у пациентов обнаружено повышение концентрации Ала ($p=0,026$; Рис. 2А) и Сер ($p=0,0001$; Рис. 2Б). Ала – аминокислота, способная превращаться в ПВК, а также обратно синтезироваться с использованием углеродного скелета ПВК, в результате одной обратимой реакции трансаминирования. Поэтому повышение концентрации Ала характерно для состояний, связанных с нарушением функции комплексов дыхательной цепи и ПДГ [Clarke С., 2013], и используется как один из лабораторных признаков при диагностике митохондриальных заболеваний [Wolf N.I., 2002]. Для Ала у пациентов, помимо повышения уровня данной аминокислоты относительно здоровых лиц, также обнаружено изменение концентрации, согласованное с изменением уровней МК и ПВК. Корреляционный анализ выявил положительную связь между уровнями МК и Ала ($r_s=0,50$; $p=0,0001$) и ПВК и Ала ($r_s=0,50$; $p=0,0003$).

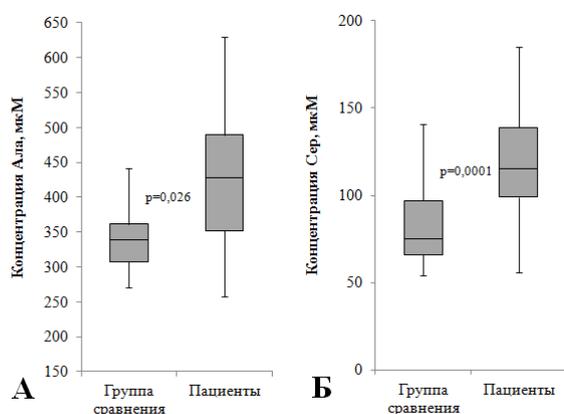


Рис 2. Концентрация аланина (А) и серина (Б) в крови у пациентов и в группе сравнения

Сер, также как и Ала, является анаплеротическим источником ПВК, но в данном случае требуется несколько биохимических реакций. Образование ПВК из Сер происходит в четыре этапа через стадию образования D-глицерата (“non-phosphorylated” pathway). Этот путь имеет большее значение в ходе глюконеогенеза, но не для биосинтеза Сер [de Koning T.J., 2003]. Образование Сер из интермедиатов гликолиза происходит на уровне 3-фосфоглицерата через ряд последовательных реакций (так называемый “phosphorylated” pathway).

Таким образом, в спектре аминокислот пациентов с развитием СН обнаружено повышение уровней Ала и Сер – аминокислот, являющихся анаплеротическими источниками ПВК. Повышение концентрации Ала связано с согласованным изменением концентраций МК и ПВК.

2.3. Выход цитохрома С в кровоток у пациентов. В группе сравнения концентрация цитохрома С (CytC) была ниже предела чувствительности использованного набора реактивов (50 нг/л) у всех лиц, за исключением одного случая, когда концентрация белка определялась на уровне 160 нг/л. Для пациентов процент обнаружения CytC в крови был значительно выше – у 15 пациентов из 94 (16%) уровень данного белка был выше 50 нг/л и составил 580 (210-670) нг/л. Концентрация МК в данной подгруппе превышала

значение в 1,1 мМ у 6 человек, двое из которых имели гиперлактатемию. Полученные результаты о том, что изменение концентраций МК и CytC в крови может быть не связано, согласуются с данными других авторов. Radhakrishnan J. и соавт. в эксперименте показали, что рост концентрации CytC на фоне тотальной ишемии тела продолжается даже после восстановления кровообращения и нормализации концентрации МК в крови [Radhakrishnan J., 2007].

Существенные изменения в спектре аминокислот обнаружены при сравнении пациентов с различным уровнем CytC. Уровень Сер был выше в подгруппе пациентов с повышенным уровнем CytC (n=10) в сравнении с лицами у кого уровень данного белка был менее 50 нг/л (n=45; Таблица 1).

Таблица 1

Различия в концентрации некоторых аминокислот между подгруппами пациентов по уровню цитохрома С

Показатель	Пациенты с уровнем CytC менее 50 нг/л, n=45	Пациенты с уровнем CytC более 50 нг/л, n=10	Уровень значимости
Сер, мкМ	109 (92-128)	121 (117-145)	p=0,016
Ала/Лиз	2,2 (1,8-2,5)	2,9 (2,4-4,0)	p=0,0005
Ала/(Фен+Тир)	3,7 (3,1-4,5)	4,9 (4,0-5,5)	p=0,0079

Также у пациентов, имеющих потерю CytC митохондриями, оказались повышенными значения показателей относительной гипераланинемии – соотношения Ала/(Фен+Тир) и Ала/Лиз [Naas R.H., 2008].

Таким образом, МД, сопровождающаяся потерей клетками CytC, наблюдалась у каждого шестого пациента. Около половины пациентов с высоким уровнем CytC не имели значительного повышения уровня МК в крови. Уровень Сер был повышен в большей степени у лиц выходом CytC из клеток в кровь.

3. Уровни эндогенного метаболита, лимитирующего синтез карнитина и транспорт жирных кислот в тканях, – триметиллизина. В группе пациентов концентрация ТМЛ оказалась значительно ниже, чем у здоровых лиц (Рис. 3).

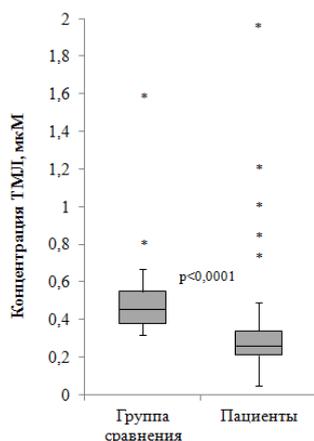


Рис. 3. Концентрация триметиллизина в группе сравнения и у пациентов

Диапазон концентраций ТМЛ у здоровых лиц составил 0,33-0,67 мкМ (5-95 перцентили). Полученные результаты сопоставимы с данными других исследований [Midttun Ø., 2013]. У пациентов гендерных различий по уровню ТМЛ, а также связи концентрации ТМЛ с возрастом, ИМТ, уровнем креатинина не выявлено.

Следует отметить, что уровни АДМА и СДМА, которые были определены совместно с ТМЛ в ходе одной аналитической процедуры, у пациентов относительно группы сравнения были существенно повышены (Рис. 4).

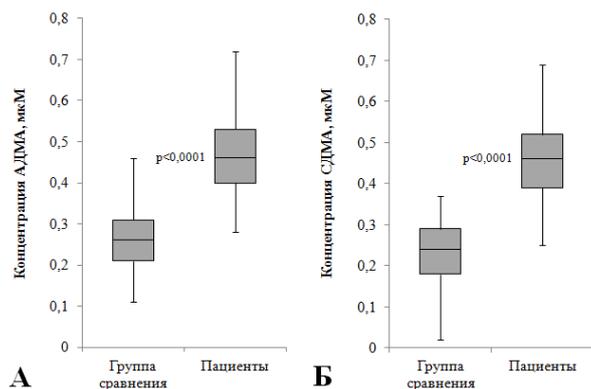


Рис. 4. Концентрации метилированных производных аргинина в группе сравнения и у пациентов
Примечание: АДМА – асимметричный диметиларгинин, СДМА – симметричный диметиларгинин.

Помимо разнонаправленных изменений у пациентов уровней ТМЛ и АДМА, СДМА, также не было выявлено статистической связи между концентрациями ТМЛ и АДМА, СДМА как у пациентов, так и в группе сравнения, в то время как между уровнями АДМА и СДМА выявлена положительная связь средней силы ($r_s=0,46$; $p<0,0001$).

ТМЛ, АДМА и СДМА возникают в результате протеолиза белков, подвергшихся метилированию по остаткам Лиз и Арг, соответственно, в ходе посттрансляционной модификации [Servillo L., 2014]. В отличие от АДМА и СДМА, ТМЛ является исходным эндогенным метаболитом, используемым в биосинтетической цепи реакций образования карнитина [Vaz F.M., 2002]. В связи с этим, концентрация свободного ТМЛ в плазме крови зависит не только от протеолиза метилированных белков, но и от интенсивности образования эндогенного карнитина. Помимо этого, одной из причин разнонаправленного изменения уровня метилированных производных Лиз и Арг у пациентов с СН может быть также различие в белках-источниках, из которых преимущественно высвобождаются в ходе протеолиза метилированные производные. Метилирование Арг в ходе посттрансляционной модификации характерно для многих белков, в том числе для быстро обновляемых регуляторных белков и белков, связанных с процессом трансляции [Obianyo O., 2012]. В отношении ТМЛ, сайты метилирования по остаткам Лиз в большом количестве содержат гистоны [Paik W.K., 2014], а также важным источником ТМЛ с учетом массы мышечной ткани в организме, по-видимому, является миозин [Hardy M.F., 1970]. Как известно, гипометилирование ДНК [Zhong J., 2016], между метилированием которой и метилированием гистонов существует прямая

взаимосвязь [Rose N.R., 2014], и саркопения [Kim T.N., 2013] наблюдаются при сердечно-сосудистой патологии и в ходе старения.

Реакция гидроксирования ТМЛ, лимитирующая скорость синтеза карнитина [Rebouche C.J., 1986], протекает в матриксе митохондрий под действием фермента ТМЛ-гидроксилазы и, следовательно, метаболизм ТМЛ связан с функцией митохондрий. В ходе корреляционного анализа между концентрацией ТМЛ и значениями отношения МК/ПВК обнаружена отрицательная связь ($r_s = -0,48$; $p = 0,0001$).

Таким образом, в ходе настоящей работы у пациентов с сердечно-сосудистой патологией и метаболическими признаками МД обнаружено снижение уровня ТМЛ, причем степень снижения ТМЛ соответствовала степени повышения показателя МК/ПВК. Уровень ТМЛ ниже значения $0,33$ мкМ, ограничивающего референтный диапазон в группе сравнения, встречался у 70% пациентов, что превышает частоту выявленных отклонений для уровня МК (47% ; $\chi^2 = 10,61$; $p < 0,01$). Для ТМЛ, в отличие от МК, не характерен обмен между тканями через кровоток. В тканях идет образование ТМЛ, но не происходит его захват из крови [Rebouche C.J., 1980]. Считается, что ТМЛ, образовавшийся в клетке, преобразуется в бутиробеталин в пределах этой же ткани. ТМЛ, попавший в кровь, по всей видимости, выводится с мочой, так как у человека реабсорбция ТМЛ в почках не происходит [Lange H.W., 1973]. Принимая во внимание данные особенности метаболизма ТМЛ, можно ожидать большую стабильность уровня ТМЛ в крови в сравнении с МК, что, вероятно, и обуславливает более высокую частоту выявленных отклонений уровня ТМЛ от значений в группе здоровых лиц. Тем не менее, следует отметить, что среди нескольких пациентов ($n = 5$), имевших уровень ТМЛ выше $0,67$ мкМ, также были обнаружены признаки МД – один пациент имел гиперлактатемию и высокий уровень ПВК, а два пациента характеризовались обнаружением CytC в крови. Из этого можно сделать вывод, что прогностичность высокого уровня ТМЛ в отношении оценки функции митохондрий, по всей видимости, является невысокой. Тем не менее, метаболическое и диагностическое значение повышения уровня ТМЛ требует дальнейшего изучения. В ряде работ для когорты лиц с выраженным атеросклеротическим поражением сосудов получены результаты о неблагоприятном прогнозе в отношении прогрессирования заболевания и выживаемости пациентов при повышении уровня ТМЛ [Løland K.H., 2013; Skagen K., 2016], хотя механизм данной ассоциации остается не ясным.

Таким образом, у пациентов с начальной стадией развития СН обнаружено снижение концентрации ТМЛ. Уровень ТМЛ статистически связан с показателем функции митохондрий – соотношением МК/ПВК, но не с концентрацией метилированных производных аргинина – АДМА, СДМА. Отклонение уровня ТМЛ у пациентов от значений в группе здоровых лиц встречалось чаще в сравнении с повышением уровней МК, ПВК и CytC. Тем не менее, высокий уровень ТМЛ в крови не исключает наличия МД.

4. PGC1 α в качестве системного маркера функции митохондрий. В группе пациентов относительно здоровых лиц обнаружено повышение концентрации PGC1 α почти в два раза ($p < 0,0001$) – 112,5 (61,0-164,6) и 61,0 (61,0-67,8) нг/л, соответственно. 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, у которых концентрация PGC1 α варьировала в больших пределах – $CV\% = 72,8$. 95-ый перцентиль значений уровня PGC1 α в группе сравнения составил 86 нг/л. Концентрация PGC1 α была выше 86 нг/л у 67 % пациентов ($\chi^2 = 7,83$; $p < 0,01$ в сравнении с частотой отклонений уровня МК от 1,1 мМ; $\chi^2 = 50,48$; $p < 0,01$ в сравнении с частотой высокого уровня СуtС у пациентов).

Корреляционная связь между уровнем PGC1 α и концентрациями СРБ, АЛТ, АСТ, КФК не была выявлена ($p > 0,05$ во всех случаях). С целью оценки того, не связаны ли полученные результаты определения уровня PGC1 α с изменением интенсивности синтеза белков в организме в целом были также определены концентрации относительно короткоживущих и быстро обновляемых белков, циркулирующих в кровотоке – инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1) и ретинолсвязывающего белка-4 (РСБ-4) [Dunger D.V., 1995; Sensi M., 1990]. Для данных белков показана возможность синтеза в различных органах и тканях [Daughaday W.H., 1989; Tsutsumi C., 1992], а также вовлеченность в патогенез ряда патологических состояний с выраженным «метаболическим» компонентом, включая инсулинорезистентность и ожирение [Yang Q., 2005; Martha S., 2008]. Группа пациентов характеризовалась в отношении концентрации белков ИФР-1 и РСБ-4 относительной однородностью ($CV\% 30$ и 36 , соответственно). Концентрация ИФР-1 и РСБ-4 в плазме крови у пациентов в целом не выходила за пределы референтных значений и составила 29,5 (24,0-36,0) мкг/л и 49,0 (40,5-63,5) мг/л, соответственно. Статистическая связь уровня PGC1 α с белками ИФР-1 и РСБ-4 также не была обнаружена.

Повышение концентрации PGC1 α в плазме крови пациентов может быть связано с активацией его синтеза в тканях, либо с повышением его потери клетками. Как отмечено выше, нами не выявлено повышения уровня маркеров клеточной проницаемости, а также отсутствовала корреляционная связь между этими показателями и концентрацией PGC1 α . Таким образом, повышение концентрации PGC1 α в периферической крови, вероятно, не связано с нарушением проницаемости клеточных мембран, а объясняется более сложным механизмом экзоцитоза. Короткое время существования (~2 часа) PGC1 α в клетке [Sano M., 2007], также один из аргументов в пользу того, что изменения концентрации данного белка в крови отражает изменение его синтеза в клетке. В связи с отсутствием связи уровня PGC1 α с концентрацией других быстро обновляемых белков плазмы РСБ-4 и ИФР-1, можно сделать вывод, что низкая концентрация PGC1 α у ряда пациентов не связана с общим угнетением синтеза белка или нарушением нутритивного статуса.

При анализе всей когорты пациентов по степени повышения МК были получены следующие результаты (Рис. 5А). Высокий уровень PGC1 α обнаруживался с одинаковой частотой как у пациентов с уровнем МК ниже 1,1 мМ (n=50), так и у пациентов с умеренным повышением уровня МК (n=34), и составил в данных подгруппах 123,5 (73,4-171,5) и 120,7 (61,0-161,9) нг/л, соответственно. Но у пациентов с уровнем МК выше 2,2 мМ (n=10) наблюдался более низкий уровень PGC1 α , составивший 61,0(61,0-107,0) нг/л, чем у остальной части пациентов – 122,1(65,9-167,4) нг/л (p=0,03).

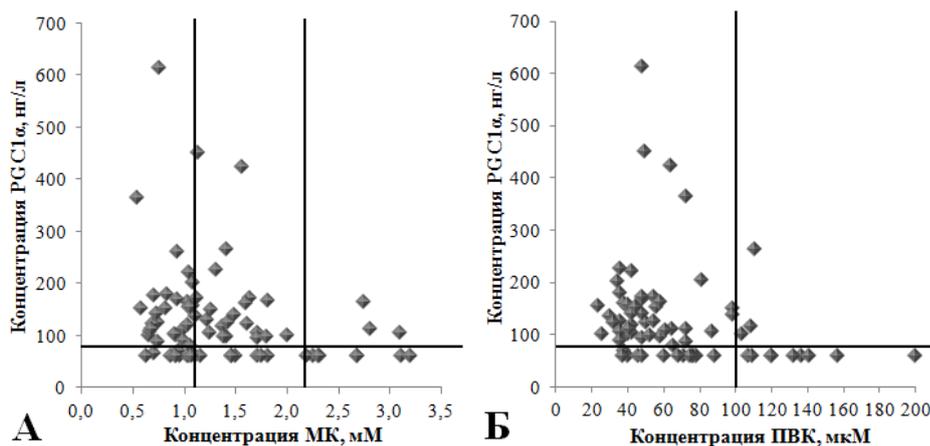


Рис. 5. Диаграммы рассеяния концентраций молочной и пировиноградной кислот и PGC1 α в группе пациентов

Примечание: МК – молочная кислота; ПВК – пировиноградная кислота; PGC1 α – 1альфа-коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом.

А. По оси абсцисс отмечены 95-ый перцентиль значений концентрации МК в группе сравнения (1,1 мМ), а также верхняя граница референтного интервала (2,2 мМ). По оси ординат: 95-ый перцентиль значений концентрации PGC1 α в группе сравнения (86 нг/л). Б. По оси абсцисс отмечена верхняя граница референтного интервала для ПВК (100 мкМ). По оси ординат: 95-ый перцентиль значений концентрации PGC1 α в группе сравнения (86 нг/л).

Таким образом, в подгруппах пациентов в зависимости от уровней МК: 1) до 1,1 мМ, n=50; 2) от 1,1 до 2,2 мМ, n=34; 3) выше 2,2 мМ, n=10, обнаружено повышение частоты встречаемости низких значений уровня PGC1 α (ниже 86 нг/л) с ростом концентрации МК. В подгруппе пациентов с гиперлактатемией частота встречаемости уровня PGC1 α ниже 86 нг/л составила 70% и была достоверно выше, чем подгруппе 1 – 28% ($\chi^2=6,46$; p<0,05). Из 7 пациентов с низким уровнем PGC1 α на фоне гиперлактатемии 6 относились к NYHA ФК II.

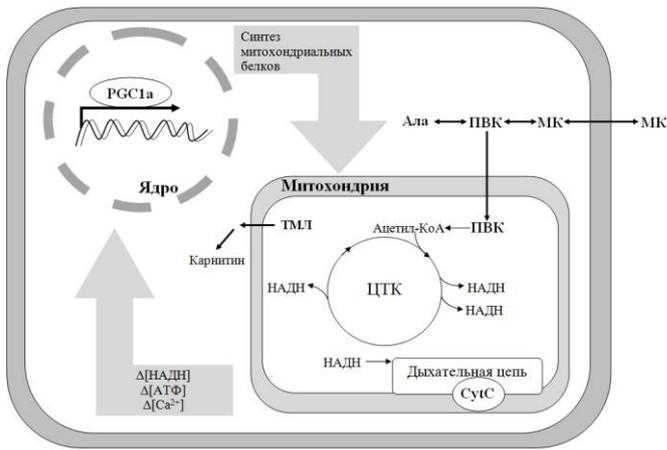
При сравнении подгрупп пациентов по уровню ПВК также обнаружено, что лица с концентрацией ПВК выше 104 мкМ (n=12) относительно остальных пациентов характеризовались более низким уровнем PGC1 α – 61,0 (61,0-61,0) и 122,1 (87,8-170,1) нг/л, соответственно (p=0,0085; Рис. 5Б). Следует отметить, что 95 перцентиль в группе сравнения (104 мкМ) для

ПВК, в отличие от МК, совпал с верхней границей референтного интервала. Кроме того, корреляционный анализ выявил в группе пациентов обратную связь концентрации ПВК с уровнем PGC1 α ($r=-0,45$, $p=0,0005$).

Высокий уровень CytC достоверно чаще встречался среди лиц с низким уровнем PGC1 α (30%) по сравнению с пациентами у кого концентрация PGC1 α превышала 86 нг/л (10%; $\chi^2=5,90$; $p<0,05$). В целом концентрация PGC1 α у лиц с высоким уровнем CytC составила 71,0(61,0-156,4) нг/л против 118,0(65,9-164,6) нг/л у лиц без повышения CytC ($p=0,083$).

По-видимому, уровень PGC1 α в крови зависит от нарушения использования энергетических метаболитов митохондрионом. Роль увеличения содержания PGC1 α в крови при отсутствии гиперлактатемии в механизме регуляции обновления митохондрия на органном уровне требует дальнейшего изучения. У пациентов с умеренным повышением уровня МК высокое содержание PGC1 α в крови может характеризовать стадию стимуляции образования так называемых гигантских митохондрий [Liesa M., Palacín M., 2009], образующихся в мышечных тканях, в том числе, при старении организма [Coleman R., 1987].

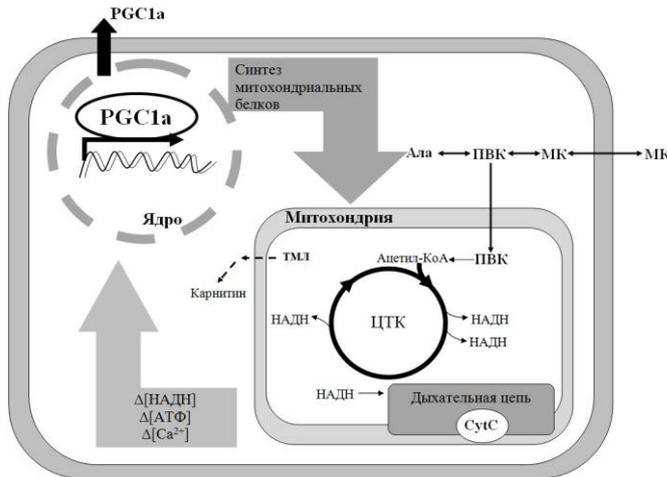
Нельзя исключить значительное прямое влияние тканевого ацидоза на биосинтез и процессинг PGC1 α и других белков. В экспериментах на мышцах показано, что хроническое повышение уровня МК в тканях сопровождается снижением экспрессии гена PGC1 α и нарушением биогенеза митохондрий [Ogasawara E., 2010]. Опубликованы данные о том, что ПВК способна ингибировать экспрессию гена PGC1 α , а также индуцировать биогенез митохондрий в миоцитах независимо от PGC1 α -ассоциированного пути при обработке культуры клеток высокими концентрациями данной кислоты (50 мМ) [Wilson L., 2007]. Таким образом, уровень PGC1 α в крови повышается, в большинстве случаев, при МД, не сопровождающейся гибелью клеток и высоким ацидозом (Рис. 6Б, В). В условиях же более глубокого нарушения функции митохондрий (гиперлактатемия, потеря CytC) синтез PGC1 α в клетках, по всей видимости, угнетается (Рис 6Г). Принимая во внимание выявленные закономерности в изменении уровня белка PGC1 α относительно других показателей функции митохондрий (Рис. 6), вероятно, что повышение в крови концентрации данного белка у пациентов отражает процесс усиления его синтеза в клетках. Увеличение частоты случаев гиперлактатемии и выхода CytC в кровотоки при низком уровне PGC1 α у пациентов, позволяет заключить, что повышение концентрации белка PGC1 α в крови в условиях нарушения кровообращения является результатом процесса, направленного на поддержание функции митохондрий. По мере прогрессирования патологического процесса возможность к синтезу PGC1 α , по всей видимости, снижается, что подтверждает гораздо более высокая частота случаев гиперлактатемии с утратой возможности выявления PGC1 α в крови среди пациентов NYHA ФК II в сравнении с NYHA ФК I. В любом случае, принимая во внимание низкие значения белка PGC1 α в крови у здоровых лиц, повышение концентрации белка PGC1 α в крови в целом следует рассматривать как неблагоприятный прогностический признак. Также



Концентрация показателей в крови

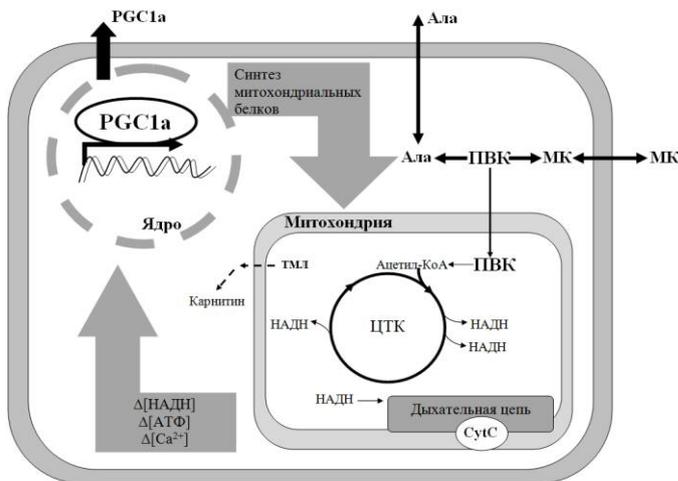
PGC1α < 86 нг/л
 МК < 1,1 мМ
 CytC < 50 нг/л

А



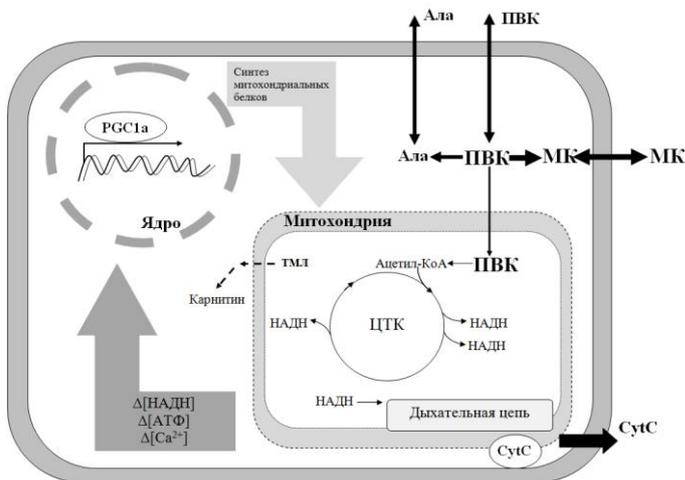
PGC1α > 86 нг/л
 МК < 1,1 мМ

Б



PGC1α > 86 нг/л
 1,1 мМ < МК < 2,2 мМ
 Ала > 400 мкМ

В



PGC1α < 86 нг/л
 МК > 2,2 мМ
 ПВК > 104 мкМ
 и/или CytC > 50 нг/л

Г

Рис. 6. Типы метаболических профилей плазмы крови, характеризующих функцию митохондрий, у здоровых лиц (А) и пациентов с развитием сердечной недостаточности (Б, В, Г)

Примечание: Метаболическая связь между показателями отражена на основании данных литературы. Увеличение толщины стрелки указывает на усиление процесса, пунктирная стрелка – на его ослабление. В отношении переноса белка PGC1a из клеток, механизм данного процесса не известен. МК – молочная кислота; ПВК – пировиноградная кислота; ТМЛ – триметиллизин; CytC – цитохром С; PGC1a – 1альфа-коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом.

необходимо отметить, что выявленные закономерности в изменении уровня PGC1a относительно других показателей функции митохондрий (Рис. 6), а именно увеличение частоты случаев гиперлактатемии и выхода CytC в кровотоки при низком уровне PGC1a у пациентов, характеризуют данный белок как показатель с невысокой прогностичностью отрицательного результата при использовании в качестве самостоятельного параметра.

Таким образом, был впервые исследован уровень PGC1a в плазме крови. Выявлено повышение концентрации PGC1a у пациентов с СН, несвязанное с неспецифическим повышением проницаемости клеток. При нарастании лакто- и пируватацидемии до концентраций выше референтных значений обнаружено снижение концентрации PGC1a в крови. Повышение концентрации CytC также ассоциировано со снижением уровня PGC1a в крови.

ВЫВОДЫ

1. У лиц с начальной стадией развития сердечной недостаточности наблюдаются метаболические признаки митохондриальной дисфункции, а именно повышение в крови концентраций молочной кислоты, аминокислот – анаплеротических источников пирувата (Ала, Сер), белка цитохрома С.
2. Предложенная модификация методики определения уровней метилированных производных аргинина для одновременной оценки уровня триметиллизина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет получать воспроизводимые результаты с точностью в пределах 95-105%. Концентрация триметиллизина у здоровых лиц в возрасте от 18 лет до 61 года находится в диапазоне 0,33-0,67 мкмоль/л, медиана 0,45 мкмоль/л.
3. При развитии сердечной недостаточности обнаружено снижение в крови концентрации эндогенного источника карнитина – триметиллизина. Уровень триметиллизина в крови не связан с концентрацией метилированных производных аргинина, которая у пациентов с сердечной недостаточностью повышена, но снижение концентрации триметиллизина ассоциировано с ростом значений соотношения лактат/пируват.

4. Клеточный белок PGC1 α , маркер усиления митохондриогенеза, обнаруживается в системном кровотоке человека, и при развитии сердечной недостаточности выявлено в среднем двукратное повышение содержания данного белка в крови. Изменение уровня PGC1 α в крови не связано с повышением неспецифической проницаемости клеточных мембран, а также динамикой концентрации быстро обновляемых белков крови.

5. Частота отклонений уровней триметиллизина и PGC1 α у пациентов с начальной стадией развития сердечной недостаточности относительно здоровых лиц в 1,5 и 4 раза выше, чем частота повышения уровней молочной кислоты и цитохрома C, соответственно.

6. Уровень белка PGC1 α в крови связан с нарушением использования энергетических субстратов митохондриями, что подтверждается низкими значениями белка PGC1 α у пациентов с гиперлактатемией и высокими значениями пировиноградной кислоты. Совместное определение белка PGC1 α и уровня молочной кислоты может быть рекомендовано для выявления нарушений биогенеза митохондрий при развитии сердечной недостаточности.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенного исследования позволяют сформулировать практические рекомендации для врачей клинической лабораторной диагностики, терапевтов и кардиологов:

1. Модифицированный вариант методики определения уровня триметиллизина и метилированных производных аргинина рекомендован к использованию в клинико-диагностических лабораториях, оснащенных оборудованием для высокоэффективной жидкостной хроматографии, для оценки пути биосинтеза эндогенного карнитина, факторов развития эндотелиальной дисфункции и обмена метильных групп.

2. Рекомендуется использовать триметиллизин в качестве дополнительного показателя при оценке нарушений липидного обмена у пациентов с сердечной недостаточностью. Уровень триметиллизина в крови ниже 0,33 мкмоль/л указывает на дефицит эндогенного предшественника карнитина, и является основанием для рассмотрения вопроса о фармакологической коррекции карнитиновой недостаточности.

3. Совместное определение уровней молочной кислоты и белка PGC1 α рекомендуется для оценки степени нарушения функции митохондрий при развитии сердечной недостаточности. Низкий уровень белка PGC1 α (< 86 нг/л) в сочетании с гиперлактатемией характеризует наиболее выраженные метаболические нарушения, при которых не рекомендуется нагрузка энергетическими субстратами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации

1. Жлоба, А.А. Уровень циркулирующего PGC1 α при сердечно-сосудистых заболеваниях / А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, **Е.С. Алексеевская**, О.М. Моисеева, Н.Д. Гаврилюк, О.Б. Иртыга // Биомедицинская химия. – 2016. – Т. 62, № 2. – С. 198-205.
2. **Алексеевская, Е.С.** Белковые маркеры обновления и гибели митохондрий у пациентов с нарушением кровообращения / **Е.С. Алексеевская**, А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, Н.Д. Гаврилюк, Т.А. Дружкова, Е.В. Жидулева, О.Б. Иртыга, О.М. Моисеева // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. – 2015. – Т. 22, № 4. – С. 73-76.
3. Жлоба, А.А. Метаболический предшественник карнитина триметил-L лизин и метилированные продукты аргинина у пациентов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы / А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, **Е.С. Алексеевская**, О.М. Моисеева, Т.А. Дружкова, Е.В. Жидулева, Н.Д. Гаврилюк, О.Б. Иртыга, Е.В. Лоцман // Артериальная гипертензия. – 2015. – Т. 21, № 6. – С. 587-594.
4. Жлоба, А.А. Метаболические и белковые маркеры митохондриальной дисфункции у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, **Е.С. Алексеевская**, О.М. Моисеева, Н.Д. Гаврилюк, О.Б. Иртыга // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, № 7. – С. 35-41.
5. Субботина, Т.Ф. Интерпретация аминокислотного профиля плазмы крови с использованием полимаркерного подхода / Т.Ф. Субботина, А.А. Жлоба, **Е.С. Алексеевская**, И.В. Бируля // Ученые записки СПбГМУ им. И.П. Павлова. – 2015. – Т. 22, № 4. – С. 76-80.
6. Zhloba, A.A. The level of circulating PGC1 α in cardiovascular diseases / A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, **E.S. Alekseevskaya**, O.M. Moiseeva, N.D. Gavriilyuk, O.B. Irtyuga // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2015. – V. 9, № 2. – P. 143-150.
7. **Алексеевская, Е.С.** Ультрафильтрация в преаналитической стадии при определении концентрации молочной кислоты в плазме крови / **Е.С. Алексеевская**, А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №11. – С. 27-30.
8. **Алексеевская, Е.С.** Возрастные особенности функционирования митохондрий / **Е.С. Алексеевская** // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. – 2013. – Т. 20, №2. – С. 17-20.

Статьи, тезисы докладов в материалах конференций и симпозиумов

9. **Алексеевская, Е.С.** Исследование нового системного биохимического показателя функции митохондрий / **Е.С. Алексеевская** // Новые задачи современной медицины: материалы IV междунар. науч. конф. (г. Санкт-Петербург, декабрь 2016 г.). – СПб.: «Свое издательство», 2016. – С. 28-31.
10. **Алексеевская, Е.С.** Разнонаправленное изменение концентрации триметиллизина и метилированных производных аргинина у пациентов с нарушением кровообращения / **Е.С. Алексеевская**, Т.Ф. Субботина, И.В. Бируля, А.А. Жлоба // «Биология и фундаментальная медицина в Санкт-Петербурге»: Материалы совещания Объединенного научного совета СПбНЦ РАН. – СПб: Изд-во «Арт-Экспресс», 2016. – С. 25-28.
11. Subbotina, T.F. Plasma amino acid profile in relation to mitochondrial dysfunction upon circulation disorders / T.F. Subbotina, A.A. Zhloba, **E.S. Alekseevskaya**, O.M. Moiseeva // Amino acids. – 2015. – V. 47, №8. – P. 1616-1617.
12. **Алексеевская, Е.С.** Проявление митохондриальной дисфункции в сдвигах аминокислотного спектра крови / **Е.С. Алексеевская** // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2015: Тезисы LXXVI научно-

- практической конференции / под ред. Н.А. Гавришевой. – СПб.: Издательство СПбГМУ, 2015. – С. 49.
13. **Алексеевская, Е.С.** Системные показатели изменения метаболических функций митохондрий у пациентов с нарушением кровообращения / **Е.С. Алексеевская** // VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные направления биохимии человека»: труды конференции / под ред. А.А. Жлобы. – СПб.: Типография «Флай Принт», 2015. – С. 13.
14. Жлоба, А.А. Снижение уровней гомоаргинаина и триметиллизина на фоне повышения содержания других производных основных аминокислот у пациентов с нарушениями кровообращения / А.А. Жлоба, Т.Ф. Субботина, **Е.С. Алексеевская**, О.М. Моисеева, Н.Д. Гаврилюк, О.Б. Иртыга // VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные направления биохимии человека»: труды конференции / под ред. А.А. Жлобы. – СПб.: Типография «Флай Принт», 2015. – С. 11-12.
15. Гаврилюк, Н.Д. Роль асимметричного диметиларгинаина в развитии патологии восходящего отдела аорты и аортального клапана / Н.Д. Гаврилюк, Т.А. Дружкова, О.Б. Иртыга, Е.В. Жидулева, **Е.С. Алексеевская**, В.Е. Успенский, Н.П. Алексеева, О.М. Моисеева // VIII Всероссийская научная конференция с международным участием «Современные направления биохимии человека»: труды конференции / под ред. А.А. Жлобы. – СПб.: Типография «Флай Принт», 2015. – С. 17.
16. **Алексеевская, Е.С.** Системные показатели изменения метаболических функций митохондрий у пациентов с нарушением кровообращения / **Е.С. Алексеевская** // VI Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения – 2015»: тезисы. – 2015. – С. 163.
17. **Alekseevskaya, E.S.** The factors of mitochondrial dysfunction and their association with ADMA / **E.S. Alekseevskaya**, A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, O.M. Moiseeva, O.B. Irtyuga // Abstract book of 7th International Symposium on Asymmetric Dimethylarginine. ADMA 2014. Endogenous Modulators of Nitric Oxide: From Mechanisms to Medicine. – St-Petersburg, 2014. – P. 23-24.
18. Zhloba, A.A. The plasma profile of metabolites influencing nitric oxide production / A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, **E.S. Alekseevskaya**, O.M. Moiseeva // Abstract book of 7th International Symposium on Asymmetric Dimethylarginine. ADMA 2014. Endogenous Modulators of Nitric Oxide: From Mechanisms to Medicine. – St-Petersburg, 2014. – P. 22.
19. Aleksandrova, L.A. Disorders of thiol metabolism in endothelial dysfunction / L.A. Aleksandrova, T.F. Subbotina, A.A. Zhloba, **E.S. Alekseevskaya**, E.V. Zhiduleva, O.M. Moiseeva // Abstract book of 7th International Symposium on Asymmetric Dimethylarginine. ADMA 2014. Endogenous Modulators of Nitric Oxide: From Mechanisms to Medicine. – St-Petersburg, 2014. – P. 16-17.
20. **Алексеевская, Е.С.** Метаболомные и протеомные показатели митохондриальной дисфункции / **Е.С. Алексеевская** // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2014: Тезисы LXXV научно-практической конференции / под ред. Н.А. Гавришевой. – СПб.: Издательство ПСПбГМУ, 2014. – С. 40-41.
21. **Алексеевская, Е.С.** Цитохром С и PGC1 α в плазме крови в качестве показателей системной митохондриальной дисфункции / **Е.С. Алексеевская** // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2014» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс] — М.: МАКС Пресс, 2014. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD-ROM; Adobe Acrobat Reader.
22. **Alekseevskaya, E.S.** Characterization of the secondary mitochondrial dysfunction by multi-scale shifts of plasma analytes / **E.S. Alekseevskaya**, T.F. Subbotina, A.A. Zhloba // FEBS Journal. 2013. – V. 280 (Suppl. 1). – P. 256-257.
23. Zhloba, A.A. Sample preparation with aminothiols derivatization for metabolic characterization of endothelial dysfunction / A.A. Zhloba, T.F. Subbotina, **E.S. Alexeevskaya**,

- I.A. Rodin, A.N. Stavriani, O.A. Shpigun // Book of Abstracts of the 1st International Symposium on Profiling 2013. – Saparica-Almada, Portugal, 2013. – P. 99.
24. **Алексеевская, Е.С.** Информативность статистического анализа широкого спектра метаболитов / **Е.С. Алексеевская** // Сборник тезисов научных работ студентов и молодых ученых 67-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 85-летию профессора Е.Н. Дормидонтова. – Ярославль, 2013. – С. 40.
25. **Алексеевская, Е.С.** Анализ широкого спектра показателей для оценки митохондриальной дисфункции / **Е.С. Алексеевская** // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2013» / Отв. ред. А.И. Андреев, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, К.К. Андреев, М.В. Чистякова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2013. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM); 12 см. – Систем. требования: ПК с процессором 486+; Windows 95; дисковод DVD-ROM; Adobe Acrobat Reader.
26. **Алексеевская, Е.С.** Метаболомный подход к оценке митохондриальной дисфункции / **Е.С. Алексеевская** // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2013: Тезисы LXXIV научно-практической конференции. – СПб.: Издательство СПбГМУ, 2013. – С. 38.
27. **Алексеевская, Е.С.** PGC1 α в качестве системного маркера митохондриальной дисфункции / **Е.С. Алексеевская** // V Международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские чтения-2013»: тезисы. – СПб.: Издательство ПСПбГМУ, 2013. – С. 118.
28. **Alexeevskaya, E.S.** The influence of preanalytical phase analysis to determine the concentration of lactate in the blood / **E.S. Alexeevskaya, A.A. Zhloba, T.F. Subbotina** // Abstract book of International conference on “Chemistry for health”. – Athens, 2012. – P. 110.
29. **Алексеевская, Е.С.** Влияние преаналитического этапа анализа на определение концентрации лактата в крови / **Е.С. Алексеевская** // Сб. «Мультидисциплинарный взгляд на метаболический синдром»: сборник тезисов научно-практической конференции. – Санкт-Петербург, 2012. – С. 9-10.
30. **Алексеевская, Е.С.** Методические особенности определения уровня молочной кислоты в крови / **Е.С. Алексеевская** // Сб. Первая Всероссийская научная конференция молодых учёных-медиков. «Инновационные технологии в медицине XXI века»: материалы конференции. – Москва, 2012. – С. 284-285.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- | | |
|--|--|
| АДМА – асимметричный диметиларгинин; | ПВК – пировиноградная кислота; |
| АЛТ – аланинаминотрансфераза; | РСБ-4 – ретинолсвязывающий белок 4; |
| АСТ – аспартатаминотрансфераза; | СДМА – симметричный диметиларгинин; |
| ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; | СН – сердечная недостаточность; |
| ЖК – жирные кислоты; | ТГ – триглицериды; |
| ИМТ – индекс массы тела; | ТМЛ – триметиллизин; |
| ИФР-1 – инсулиноподобный фактор роста 1; | СytC – цитохром C; |
| КФК – общая креатинфосфокиназа; | NYHA ФК – функциональный класс сердечной недостаточности по классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA); |
| МД – митохондриальная дисфункция; | PGC1 α – 1альфа-коактиватор гамма-рецептора, активирующего пролиферацию пероксисом. |
| МК – молочная кислота; | |
| мтДНК – митохондриальная ДНК; | |