

Метиларгинины крови и нарушение регуляции биодоступности оксида азота у пациентов гемодиализа

М.А. Гилинский¹, С.И. Анохин², С.А. Королева², Т.В. Латышева¹, Г.М. Петракова¹, Р.А. Суховершин¹

¹ НИИ физиологии СО РАМН,

² ФГБУЗ «Сибирский окружной медицинский центр Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУЗ «СОМЦ ФМБА»), г. Новосибирск

Blood methylarginines and disturbed regulation of nitric oxide bioavailability in patients on hemodialysis

M.A. Gilinsky¹, S.I. Anokhin², S.A. Koroleva², T.V. Latysheva¹, G.M. Petrakova¹, R.A. Suhovershin¹

¹ Institute of Physiology, Siberian branch of RAS, Novosibirsk,

² Siberian Regional Medical Center, Novosibirsk

Ключевые слова: L-аргинин, метиларгинины, оксид азота, моноамины, корреляции, гемодиализ.

Изучение роли метиларгининов (МА) в регуляции биодоступности оксида азота (NO) показало, что монометиларгинин (ММА) и асимметричный диметиларгинин (АДМА) конкурентно угнетают NO-синтазу (NOS). Симметричный диметиларгинин (СДМА) не активен в отношении NOS, но регулирует трансмембранный транспорт L-аргинина – субстрата NOS. Установлено, что при высокой концентрации МА в крови нарушаются многие, зависящие от NO, функции сосудов. Высокие уровни МА способствуют развитию атеросклероза и гипертонии.

При помощи ВЭЖХ с электрохимической и флуориметрической детекцией измерены концентрации МА, серотонина (5ОТ), его метаболита (5ГИУК) и катехоламинов в крови здоровых людей и пациентов гемодиализа. Уровни АДМА, ММА и СДМА пациентов значительно превышали уровни контрольной группы. Гемодиализ снижал эти уровни, но не все до нормальных значений. Уровни 5ОТ бедной тромбоцитами плазмы пациентов в 6 раз, а 5ГИУК почти в 30 раз превышали таковые в контроле. Диализ не влиял на уровни аргинина плазмы и 5ОТ тромбоцитов. Значимые корреляции обнаружены между параметрами моноаминов и метиларгининов у пациентов гемодиализа, но не в контрольной группе.

Полученные данные свидетельствуют, что при анализе патологии сосудов у пациентов гемодиализа недостаточно приписывать ее любой отдельно взятой из исследованных систем. Необходимо учитывать возможность их взаимодействия и взаимозамещения. Анализ собственных и литературных данных позволяет также считать, что негативная корреляция аргинина и норадреналина отражает особенности реакции на медикаментозный стресс, характерные для гипертонии.

Studies of the role of methylarginines (MA) in the regulation of nitric oxide (NO) bioavailability showed that monomethylarginine (MMA) and asymmetric dimethylarginine (ADMA) competitively inhibit NO-synthase (NOS). Symmetric dimethylarginine (SDMA) is not active in respect of NOS. It however regulates transmembrane transport of L-arginine – a NOS substrate. High MA concentration in blood MA was shown to depresses many vascular functions which depend on NO. High level of MA contributes to the development of atherosclerosis and hypertension.

Blood concentrations of MA, serotonin (5-HT), its metabolite (5-HIAA) and catecholamines were measured using HPLC with electrochemical and fluorometric detectors in healthy individuals and hemodialysis patients. The levels of ADMA, MMA and SDMA were significantly higher in hemodialysis than in control group. Hemodialysis reduced these levels, but not completely restored their normal values. Level of 5-HT in platelet-poor plasma was 6 times higher, and 5-HIAA was almost 30 times higher in hemodialysis patients than in the control group. Dialysis had no effect on plasma arginine and platelet 5-HT. Significant correlations were found between monoamines and methylarginines in hemodialysis patients, but not in the control group.

Our data suggest that vascular pathology in hemodialysis patients could not be attributed to any systems studied. One should keep in mind their interaction and mutual substitution. Our and literature data allow one to assume that negative correlation between arginine and norepinephrine reflects the peculiarities of reaction to the medication stress which are characteristic for hypertensive patients.

This work was supported by RFBR grant 08-04-00951.

Key words: *L-arginine, methylarginines, monoamines, correlations haemodialysis.*

Введение

Среди пациентов с терминальной стадией хронической почечной недостаточности (ТХПН) было обнаружено ускоренное развитие атеросклероза и гораздо более широкое распространение сердечно-сосудистых заболеваний, чем у людей, не страдающих ХПН. Lindner et al. [22] обратили внимание на распространенность смертности от сердечно-сосудистых осложнений, возникающих в результате раннего развития атеросклероза у пациентов с почечной недостаточностью в терминальной стадии. В этой популяции пациентов продукция NO была существенно снижена [29]. По данным Американской ассоциации по исследованию сердца, даже небольшая почечная дисфункция является фактором риска для сердечно-сосудистой системы [28]. Одной из основных причин этого считается [9, 14, 17, 19, 35] снижение у почечных больных биодоступности оксида азота (NO) из-за накопления в крови конкурентных блокаторов NO синтазы монометиларгинина (ММА) и асимметричного диметиларгинина (АДМА). Симметричный диметиларгинин (СДМА) не влияет на NO-синтазу, но модулирует трансмембранный транспорт субстрата этого фермента, L-аргинина [30]. Результаты массового проспективного исследования подтверждают такую гипотезу [34].

Реально уровень АДМА оказывается увеличенным не только при терминальных стадиях почечной недостаточности [19, 35]. Он значимо повышен и у пациентов с прогрессирующими хроническими заболеваниями почек, причем даже на начальных стадиях болезни, когда почечная функция не нарушена [29, 33]. Еще одно наблюдение убедительно свидетельствует о том, что повышение уровня АДМА играет негативную роль в деятельности самих почек. В дозах, превышающих физиологические, эта аминокислота, не изменяя скорости гломерулярной фильтрации, вызывает вазоконстрикцию почечных сосудов и создает условия, присущие гломерулярной гипертензии [18].

Почечная недостаточность сопровождается существенными изменениями концентрации в крови серотонина, катехоламинов [3–5, 31, 36] и метиларгининов [14, 17]. При этом высокие уровни метиларгининов могли служить маркерами тяжести заболеваний и даже предвестниками гибели пациентов [8, 27, 34, 35].

Изменение концентрации метиларгининов и моноаминов крови сопровождается значительными сдвигами как в функциях периферических органов, так и в активности центральной нервной системы [2]. Эти факты определяют потребность в оценке влияния гемодиализа (ГД) на уровни метиларгининов и моноаминов крови. Данные об изменении уровней моноаминов были опубликованы ранее в настоящем журнале [3]. Интерес представляет также информация о возможной корреляции показателей активности моноаминов и метиларгининов как между собой, так и с доступны-

ми биохимическими параметрами крови пациентов, страдающих ТХПН и получающих ГД. Выяснению этих вопросов посвящена настоящая работа.

Материалы и методы

В работе представлены данные анализов крови 20 пациентов отделения гемодиализа и гемокоррекции ФГБУЗ «СОМЦ ФМБА» с ХПН, получающих программный ГД (14 мужчин, 6 женщин). Средняя длительность лечения ГД составляла 31 месяц (медиана 41, SD = 17,5). Группа контроля состояла из 18 здоровых мужчин. Различия в возрасте между группами не были достоверными и не отражались на направлениях и значимости различий биохимических показателей групп контроля и диализа. Различий в данных, полученных у мужчин и женщин группы диализа, также не обнаружено. Для оценки динамики моноаминов, аргинина и метиларгининов забор крови из локтевой вены производился у всех пациентов до диализа, через 2 и 4 часа диализа. У некоторых пациентов в зависимости от веса тела и типа диализаторов (в основном Fresenius, F8) процесс диализа продолжался и после 4 часов. Протокол эксперимента был согласован с этическим комитетом НИИ физиологии СО РАМН.

Методика определения катехоламинов, серотонина (5OT) и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-ГИУК) крови описана детально ранее, в том числе в этом журнале [1, 3]. Основные моменты представлены вкратце ниже.

Определение моноаминов. Кровь для анализов собирали в вакутейнер, с EDTA и центрифугировали (+4 °C, 15 мин, 150 g) для осаждения эритроцитов и получения богатой тромбоцитами плазмы (БГ). 0,5 мл БГ центрифугировали (10 мин, 6000–8000 g) для получения тромбоцитарной таблетки и бедной тромбоцитами плазмы [25]. После осаждения белков хлорной кислотой 5 мкл закисленной, бедной тромбоцитами плазмы (БД) инжестировали в хроматограф. Тромбоцитарная таблетка гомогенизировалась в 0,5 мл 0,1 М хлорной кислоты и после центрифугирования через 1 час содержания в холодильнике 5 мкл супернатанта также инжестировалось в хроматограф для определения 5OT тромбоцитов (ТВ).

Пробоподготовка для определения катехоламинов состояла в концентрации их на окиси алюминия (с дигидроксибензиламином в качестве внутреннего стандарта). Элюция с окиси алюминия проводилась 0,1 М хлорной кислотой. Элюат инжестировался в хроматограф. Хроматографическое оборудование состояло из шприцевых насосов, узлов ввода пробы и колонок хроматографа «Милихром-1» («Научприбор», Россия), потенциостатов LC-4A и стеклоуглеродных электродов TL-4 (Bioanalytical Systems Inc., США). Потенциал рабочего электрода устанавливался на уровне +0,6 В относительно хлорсеребряных референтных электродов. Для

хроматографии моноаминов использовали колонки из нержавеющей стали 2 × 65 мм, упакованные сорбентом Nucleosil C18, 5 мкм (Macherey-Nagel, Германия). Подвижная фаза для катехоламинов состояла из 0,1 М фосфат-цитратного буфера (рН 5,6), содержавшего 0,5 г/л октилсульфоната натрия и 70 мг/л EDTA (Sigma, USA) с добавлением 12% метанола. Для анализа серотонина к буферу добавляли 0,15 г октилсульфоната, устанавливали рН 3,2 и добавляли 14–15% метанола. Скорость подачи элюента составляла 100 мкл/мин.

Определение L-аргинина и метиларгининов. L-аргинин и его метилированные производные определялись в плазме и моче по методике Тирлинка [15, 32]. Процедура выполнялась в 3 этапа: 1) выделение основных аминокислот путем твердофазной экстракции; 2) дериватизация ортофталевым диальдегидом; 3) анализ при помощи высокоэффективной хроматографии с флуоресцентной детекцией. Детали работы приведены ниже.

1. Образец плазмы центрифугировали 8 минут при 10 тыс. g. 200 мкл супернатанта разбавляли до 1 мл физраствором, забуференным фосфатом натрия до рН 7,4. Этот раствор пропускали через концентрирующий картридж (Oasis SCX, 30 mg, 1 ml, Waters, США), предварительно промытый 1 мл метанола и 1 мл 50 мМ фосфатного буфера (рН 7). После нанесения образца картридж мыли 1 мл метанола и 1 мл 50 мМ соляной кислоты. Вещества элюировали раствором, состоявшим из воды, метанола и аммиака в соотношении 5:4:1. К элюенту добавляли 50 мкл 1М гидроокиси натрия. Элюат высушивали на водяной бане при температуре 60–70 °С в токе азота.

2. В день анализа сухой остаток растворяли в 200 мкл воды. К 50 мкл раствора добавляли 50 мкл рабочего раствора дериватизатора. Маточный раствор состоял из 5 мг ортофталевого диальдегида, 100 мкл метанола, 900 мкл борного буфера (рН 9,5) и 15 мкл меркаптопропионовой кислоты. Для приготовления рабочего раствора маточный разбавлялся в день эксперимента борным буфером в 5 раз. Через 8–10 минут реакции к смеси образца и дериватизатора добавляли 50 мкл 0,2 М фосфата калия для закисления раствора с целью сбережения колонки. 20 мкл дериватизированного образца инжестировали в хроматограф.

3. Хроматограф состоял из 2 насосов LC-10ADvp, аутоинжектора SIL-10Advp, контроллера SCL-10Avr, и флуоресцентного детектора RF-10Ax1 (все фирмы Shimadzu, Япония). Длина волны возбуждения составляла в детекторе – 340 нм, эмиссии – 455 нм. Для разделения пиков использовали колонку C₁₈, 100 × 2 мм, 3 мкм (Phenomenex, США). Состав элюента: калий фосфатный буфер рН 7,0 и ацетонитрил (6,4 %). Скорость подачи элюента составляла 200 мкл/мин. Второй насос подавал смесь вода/ацетонитрил (50/50) для быстрой промывки колонки после выхода исследуемых веществ. Время выхода последнего метиларгинина составляло 16–18 мин. Полное время анализа и адаптации – 27 мин. Обработка хроматограмм моноаминов осуществлялась программно-аппаратным комплексом «Мультихром» (Амперсэнд, Россия), а аминокислотных хроматограмм – программой LC-solution (Shimadzu). Статистическая обработка проводилась методами непараметрической статистики при уровне достоверности $p < 0,05$.

Результаты

104 Нефрология и диализ • Т. 14, № 2 2012

Результаты исследований моноаминов групп пациентов и контроля приводились ранее в этом журнале [3]. В связи с последующим корреляционным анализом мы повторяем часть этих данных в табл. 1. Численные характеристики моноаминов и метиларгининов сопоставляются в контроле и у больных ХПН в табл. 2.

Концентрация 5ОТ в тромбоцитах (на один миллилитр плазмы) группы контроля более чем в 6 раз превышала таковую у пациентов с ХПН. В то же время 5ОТ бедной тромбоцитами плазмы, содержание которого в норме составляет не более 5% от совокупного уровня 5ОТ крови [31], оказался при ХПН повышенным почти в 15 раз и достиг 40% от совокупного уровня. Чрезвычайно высокой оказалась концентрация 5ГИУК в бедной плазме, которая превышала уровень контроля в 32 раза. Содержание 5ГИУК в тромбоцитах оказалось весьма малым (около 0,5 нг/мл до и 1,2 нг/мл после диализа). В настоящей работе концентрация 5ГИУК в богатой плазме детально не анализировалась.

Уровень L-аргинина в плазме пациентов гемодиализа не отличался значимо от уровня контрольной группы (табл. 2). В отличие от этого концентрации метиларгининов высокосзначимо превышали концентрации в группе контроля. Так, уровень ММА был почти в 6 раз выше, чем в контроле; СДМА – в 4,2 раза, а АДМА – в 1,7 раза выше уровня контроля (для всех $p < 0,001$).

Значительный интерес представляют данные о влиянии гемодиализа на показатели биогенных аминов и метиларгининов (табл. 2). Friedman ANOVA для повторных измерений показывает значимый эффект процедуры диализа (снижение концентрации) в отношении 5ОТ и 5ГИУК бедной плазмы ($\text{Chi Sqr.} = 16,67$; $p = 0,00024$; и $\text{Chi Sqr.} = 20,13$; $p = 0,00004$ соответственно). Достоверных различий в концентрациях катехоламинов плазмы и серотонина тромбоцитов до и после диализа

Таблица 1
Результаты анализов групп хронической почечной недостаточности и контроля

	ХПН n = 20	Контроль n = 18	Досто- верность различий
Возраст, лет	43 ± 9,8	33,4 ± 10,7	p = 0,1
Пол (муж.)	14/20	18/18	
Длительность диализа, мес.	31 ± 17,5	–	
Эритроциты, 10 ¹² /л	3,8 ± 0,99	4,6 ± 0,39	p < 0,10
Гематокрит, %	32,9 ± 4,8	42,0 ± 3,1	p > 0,10
Гемоглобин, г/л	111,1 ± 14,2	138,5 ± 8,4	p < 0,025*
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	222,6 ± 47,4	310 ± 82,7	p < 0,005*
Мочевина, ммоль/л	31,5 ± 7,0	5,76 ± 1,78	p < 0,001*
Креатинин, мкмоль/л	828,1 ± 160,4	82,4 ± 14,1	p < 0,001*
АЛТ, ед/л	11,9 ± 17,1	36,8 ± 19,9	p < 0,001*
Холестерин, ммоль/л	4,95 ± 0,59	5,06 ± 0,66	p > 0,10
Гипотензивная терапия	15/20	–	
Эритропоэтин	20/20	–	

Примечание. Данные представлены как $M \pm SD$. * – индикатор достоверности различий.

Таблица 2

Влияние процедуры диализа на моноамины, L-аргинин и метиларгинины крови

Моноамины, аргинин и метиларгинины	Контроль, n = 18, M ± SD	Пациенты с ХПН, n = 20, M ± SD			Значимость различий контроль – ХПН	Значимость различий до диализа – 4 ч диализа
		До диализа	2 часа диализа	4 часа диализа		
НА, нмоль/л	2,50 ± 0,93	2,69 ± 1,287	2,02 ± 0,989	2,15 ± 0,826	p > 0,10	p = 0,157
А, нмоль/л	0,34 ± 0,31	0,76 ± 0,488	0,56 ± 0,306	0,58 ± 0,519	p < 0,01	p = 0,974
ТБ 5ОТ, мкмоль/л	1,63 ± 0,77	0,252 ± 0,164	0,241 ± 0,124	0,30 ± 0,127	p < 0,001	p = 0,180
БД 5ОТ, мкмоль/л	0,028 ± 0,054	0,171 ± 0,246	0,09 ± 0,085	0,07 ± 0,112	p < 0,001	p = 0,00002
БД 5ГИУК, мкмоль/л	0,052 ± 0,054	1,68 ± 1,101	0,531 ± 0,134	0,673 ± 0,513	p < 0,001	p = 0,00003
Арг, мкмоль/л	76,02 ± 17,54	83,342 ± 24,893	75,931 ± 22,268	71,101 ± 22,178	p > 0,10	p = 0,0262
ММА, мкмоль/л	0,076 ± 0,013	0,435 ± 0,588	0,182 ± 0,303	0,313 ± 0,568	p < 0,001	p = 0,011
АДМА, мкмоль/л	0,363 ± 0,05	0,629 ± 0,303	0,428 ± 0,222	0,388 ± 0,102	p < 0,001	p = 0,00004
СДМА, мкмоль/л	0,588 ± 0,19	2,482 ± 0,842	1,482 ± 0,424	1,509 ± 0,697	p < 0,001	p = 0,00004

Примечание. ТБ – тромбоциты; БД – бедная тромбоцитами плазма; НА – норадреналин; А – адреналин; ТБ 5ОТ – серотонин тромбоцитов; БД 5ОТ – серотонин бедной тромбоцитами плазмы; БД 5ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота бедной тромбоцитами плазмы; Арг – L-аргинин; ММА – монометиларгинин; АДМА – асимметричный диметиларгинин; СДМА – симметричный диметиларгинин. Данные представлены как M ± SD.

не обнаружено. На основании данных этой таблицы можно заключить, что в группе ХПН: 1) концентрации катехоламинов крови и серотонина тромбоцитов под влиянием гемодиализа выявили лишь тенденцию к снижению. Значимого влияния на эти параметры крови гемодиализ не оказал; 2) в бедной тромбоцитами плазме основное падение уровней 5ОТ и 5ГИУК происходило за первые 2 часа диализа. В дальнейшем содержание этих веществ почти не менялось.

Эффект диализа оказался достоверным для всех трех метиларгининов. Концентрация L-аргинина после диализа не отличалась значимо от исходной величины (см. табл. 2). Только АДМА снижался в результате гемодиализа до уровня контроля. Концентрации ММА и СДМА в плазме, несмотря на 4 ч диализа, оставались значительно выше нормы. Как и в случае 5ОТ и 5ГИУК бедной плазмы, основное снижение концентраций метиларгининов происходило за первые 2 ч диализа.

8 из 20 пациентов с ХПН выявили признаки депрессии. У 9 пациентов была обнаружена интрадиализная гипотензия. Сравнение измерявшихся показателей в группах с депрессией и без нее показало существование достоверных различий в концентрации постдиализной 5ГИУК в бедной плазме (соответственно 116 и 74 нг/мл, p = 0,034). Различий в уровнях моноаминов и метаболитов между группами интрадиализной гипотонии и отсутствия таковой не выявлено. В этих группах различались значимо только уровни L-аргинина до диализа (90,89 и 74,12 мкмоль/л, p < 0,05).

В попытке проследить связь различных параметров крови и параллелизм их изменений были рассчитаны коэффициенты корреляции между наборами данных. Распределения многих параметров не были нормальными, в связи с чем коэффициенты корреляции определялись по Спирмену (Spearman). Для метиларгининов и индолов n = 20, а для катехоламинов n = 14–17. Основные результаты представлены в табл. 3 и сводятся к следующему.

1. Уровни L-аргинина и всех метиларгининов плаз-

мы, а также БД 5ОТ, ТБ 5ОТ и БД 5ГИУК, измеренные после 4 ч гемодиализа, значимо коррелировали с исходными уровнями (строки 1–4 левой и 1–3 правой панелей).

2. Корреляций между ТБ 5ОТ и БД 5ОТ бедной плазмы на этапах исследования не обнаружено.

3. Строки 6–11 левой панели демонстрируют корреляции между метиларгининами. Примечательно, что ни один из них не коррелировал с L-аргиномом.

4. Значимые корреляции связывали исходные уровни норадреналина (НА) и L-аргинина с постдиализными уровнями БД 5ГИУК (строки 13–15 левой панели). Отметим, что в контрольной группе уровень 5ГИУК надежно коррелировал с уровнем НА (r = 0,66, p < 0,006). Предположительно, корреляция может реализоваться за счет участия MAO A.

5. Наконец, в строках 7–13 правой панели показаны корреляции индолов и метиларгининов. При этом ТБ 5ОТ коррелировал с соответствующим по времени значением СДМА, а БД 5ОТ и БД 5ГИУК коррелировали с соответствующими значениями ММА. В контроле корреляций между индолами и метиларгининами не обнаружено.

Наши данные по серотонину хорошо соотносятся с наблюдениям К. Sebekova и соавторов [31]. Сравнительно небольшие различия между концентрацией 5ОТ в бедной плазме пациентов с ХПН и группы контроля связаны с относительно высокими концентрациями 5ОТ в плазме группы контроля. В основном этот факт может объясняться нарушением целостности тромбоцитов при подготовке образцов [1, 25]. Аналогичные нашим концентрации 5ОТ в норме приведены в обзоре Lechin [21].

Гипотензия, часто развивающаяся при гемодиализе, ассоциируется в литературе с нарушением серотонинового обмена [11]. В ее основе может лежать усиление продукции эндотелиального оксида азота, вызванное высвобождением 5ОТ из активированных диализом тромбоцитов [12]. Активация тромбоцитов происходит

Таблица 3

Корреляции между концентрациями в плазме пациентов норадреналина, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты с L-аргинином и метиларгининами

№№	Корреляционные пары	Spearman R	Значение p	Корреляционные пары	Spearman R	Значение p
1	Арг-до – Арг-4ч	0,6246	0,0019	ТБ 5ОТ-до – ТБ 5ОТ-4ч	0,6190	0,0021
2	ММА-до – ММА-4ч	0,7123	0,0006	БД 5ОТ-до – БД 5ОТ-4ч	0,666	0,0007
3	АДМА-до – АДМА-4ч	0,5772	0,0029	БД 5ГИУК-до – БД 5ГИУК-4ч	0,7584	0,0001
4	СДМА-до – СДМА-4ч	0,9193	0,0000	ТБ 5ОТ-до – БД 5ГИУК-4ч	0,5637	0,0063
5				БД 5ОТ-до – БД 5ГИУК-до	0,6733	0,0006
6	ММА-до – АДМА-до	0,5667	0,0114			
7	ММА-до – СДМА-до	0,6649	0,0019	ТБ 5ОТ-до – СДМА-до	0,5906	0,0078
8	АДМА-до – СДМА-до	0,4982	0,0299	БД 5ОТ-до – ММА-до	0,6845	0,0012
9	ММА-4ч – АДМА-4ч	0,8509	0,0000	БД 5ГИУК-до – ММА-до	0,7404	0,0003
10	ММА-4ч – СДМА-4ч	0,4211	0,0726	ТБ 5ОТ-4ч – СДМА-4ч	0,5158	0,0238
11	АДМА-4ч – СДМА-4ч	0,4684	0,0431	БД 5ОТ-4ч – ММА-4ч	0,5158	0,0238
12	НА-до – Арг-до	-0,614	0,0051	БД 5ГИУК-4ч – ММА-4ч	0,6677	0,0025

Примечание. ТБ – тромбоциты; БД – бедная тромбоцитами плазма; НА – норадреналин; А – адреналин; ТБ 5ОТ – серотонин тромбоцитов; БД 5ОТ – серотонин бедной тромбоцитами плазмы; БД 5ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота бедной тромбоцитами плазмы; Арг – L-аргинин; ММА – метиларгинин; АДМА – асимметричный диметиларгинин; СДМА – симметричный диметиларгинин; до – значение до процедуры гемодиализа; 4ч – после 4 часов гемодиализа.

как в результате контакта с капиллярами диализатора, так и за счет других факторов, например, за счет влияния низкомолекулярного гепарина. В наших исследованиях достоверной связи интрадиализной гипотензии с уровнем моноаминов не было обнаружено [3]. Концентрации же L-аргинина в группах интрадиализной гипотонии и отсутствия таковой различались значительно. Разные уровни этого субстрата NO синтазы в группах могут представлять основу механизма, обеспечивающего различие артериального давления.

Значительная часть (от 20 до 35% и более) пациентов в терминальной стадии ХПН, по данным литературы, страдает коморбидной депрессией [7, 20]. Анализ литературы позволил связать депрессию с уровнем смертности диализных больных [20], что придает особую важность ранней диагностике и определению путей воздействия. Мы зарегистрировали депрессию в 40% случаев, причем была показана связь депрессии с изменением обмена серотонина [3]. Зависимости появления коморбидной депрессии от характеристик регуляции оксида азота (аргинина и метиларгининов) нами не обнаружено.

Соотношение концентрации тромбоцитов и уровня серотонина в миллилитре крови показывает, что при ХПН содержание серотонина в тромбоцитах падает. Весьма высокий уровень 5ГИУК бедной плазмы в нашем исследовании, скорее всего, отражает резкое снижение почечной фильтрации при ХПН.

Измеренные нами значения концентраций L-аргинина и метиларгининов в группах контроля и диализа (табл. 2) не отличаются принципиально от приводимых в литературе [23, 29]. По данным некоторых авторов, концентрация L-аргинина у пациентов с ХПН была значительно ниже, чем в контроле [13, 24]. Сегодня трудно объяснить эти различия в наблюдениях. Одна из гипо-

тез [13] увязывает снижение концентрации L-аргинина в крови додиализных пациентов с ХПН с увеличением транспорта этой аминокислоты в эритроциты. Следует отметить, что у пациентов, использующих гемодиализ, концентрация аргинина в крови (вне процедуры) была выше, чем при ХПН без диализа. В этом случае различия с контролем сводились к минимуму [13, 16]. Сама процедура гемодиализа, как в наших исследованиях, так и по данным литературы, не влияла на концентрацию L-аргинина в крови (табл. 2).

В отличие от L-аргинина уровень всех метиларгининов был достоверно увеличен у пациентов с ХПН в сравнении с контролем (табл. 2). Процедура гемодиализа (4 ч) возвращала уровень АДМА практически к нормальным значениям. Концентрации ММА и СДМА в крови тоже достоверно снизились по сравнению с концентрациями до диализа, но не достигли значений контроля. Примечательно, что основные изменения концентраций метиларгининов регистрировались уже через 2 ч диализа. Отношение АДМА/креатинин плазмы составляло до диализа 0,81, а после диализа 1,17 (различия достоверны по Wilcoxon при $p = 0,0006$). Отношение СДМА/креатинин до диализа составляло 3,3, а после – 4,5 ($p = 0,00005$). Таким образом, наши данные показывают, что уровень креатинина в плазме снижается при диализе быстрее, чем метиларгининов. Этот факт был отмечен [23] и объяснен связыванием метиларгининов белками плазмы [10].

Следует отметить, что выведение метиларгининов зависит от интенсивности почечной экскреции, в частности от канальцевой реабсорбции [6]. По данным этих авторов, у человека в норме экскретируемые фракции АДМА и СДМА составляют соответственно 68,2 и 71%. У контрольных крыс эти величины равны 1,1 и 71,2%, а у мышей соответственно 35,1 и 53,1%. Проведенные

расчеты позволили представить величину канальцевой реабсорбции АДМА в контроле [6]. У человека она составила 35,1%, у крыс – порядка 99%, а у мышей – 62,4%. Реабсорбированная фракция SDMA составила у человека 27,7%, у крыс – 27,4%, у мышей – 44%. У пациентов с ХПН без диализа (клиренс креатинина <30 мл/мин) экскреция АДМА снижалась в 5 раз, в то время как экскреция SDMA снижалась только в 1,7 раза. У крыс реальная экскреция АДМА появлялась только при почечной недостаточности.

Интерес представляют корреляции зарегистрированных нами параметров (табл. 3).

Следует отметить достаточно высокую корреляцию между значениями до и после гемодиализа для индолов, а также для аргинина и метиларгининов. Это свидетельствует о низкой специфичности полисульфоновой мембраны диализеров в отношении анализированных веществ. Как показывают строки 6–11 левой панели табл. 3, все метиларгинины значимо коррелируют между собой, но не с аргинином.

Примечательно отсутствие корреляций между уровнями серотонина тромбоцитов и бедной плазмы, хотя тот и другой значимо коррелируют с БД 5ГИУК. Можно думать, что БД 5ГИУК, уровень которой определяется внутриклеточной деградацией серотонина под влиянием моноаминоксидазы А (МАО А), свободно выходит в плазму. Выход же 5ОТ из тромбоцитов в плазму и обратный транспорт медиатора не связаны причинно между собой и инициируются независимо. Наши данные показывают, что корреляции между индолами и метиларгининами при сходных коэффициентах корреляции характеризуются более высокой достоверностью до гемодиализа, чем после него. Наибольшее количество корреляций с индолами имеет ММА. Причины этого сегодня неясны. В наших опытах не обнаружено корреляций между норадреналином и АДМА, как это описано в работе Zoccali et al. [36]. Причина этого может лежать в различии исследованных групп пациентов (например, в различии употребляемых медикаментов).

Заслуживает внимания значимая отрицательная корреляция между норадреналином и аргинином до диализа. Отрицательная корреляция этих субстанций наблюдалась у гипертензивных крыс SHR при гипотензии, индуцированной блокатом кальциевых каналов никардипином (Nifedipine) [26]. Уровень L-аргинина падает только у крыс SHR на фоне роста концентрации норадреналина (НА) в крови при снижении артериального давления. Снижение уровня L-аргинина у гипертензивных, но не нормальных крыс упоминается в дискуссии этой работы и для случая выброса НА при водно-иммерсионном стрессе, а также при непосредственной инфузии НА в вену.

Мы подсчитали коэффициент корреляции между аргинином и норадреналином в наших исследованиях. Он оказался отрицательным и значимым ($r = -0,614$; $p = 0,0051$). В контрольной группе достоверной связи между этими параметрами не выявлено. Если учесть, что у 15 из 20 пациентов зарегистрирована гипертензия (табл. 1), то появляется аналогия с данными эксперимента на животных. Следует, однако, иметь в виду, что уровень НА у пациентов не отличался от контроля, а стресс проявлялся при ХПН только в увеличении в крови концентрации адреналина, который сам до-

стоверной корреляции с аргинином не имел. Так что полного соответствия описанным моделям [26] не было. Тем не менее можно думать, что тест на снижение в крови уровня L-аргинина в ответ на стресс и/или рост концентрации НА может представлять интерес при определении характеристик гипертензии и у человека, чем мы и занимаемся в настоящее время.

Выводы

1. У больных хронической почечной недостаточностью, находящихся на программном гемодиализе, значительно повышены концентрации метиларгининов в крови, что свидетельствует о нарушении регуляции биодоступности оксида азота в организме.

2. Гемодиализ снижает концентрации метиларгининов, но только АДМА достигает значений, свойственных контрольной группе.

3. В наших исследованиях не обнаружено различий в уровнях субстрата NO синтазы L-аргинина между пациентами гемодиализа и здоровыми людьми. Процедура гемодиализа не изменила значимо концентрации L-аргинина в крови больных ХПН.

4. Обнаружены достоверные корреляции между значениями параметров серотонинергической системы и метиларгининами. Таким образом, часть эффектов, приписываемых изменениям концентрации метиларгининов, может быть обусловлена у этих пациентов изменениями в серотонинергической системе.

5. Выявлена достоверная отрицательная корреляция уровней L-аргинина и норадреналина у больных ХПН. Эта связь, вероятно, отражает некомпенсированный при гипертензии рост потребления L-аргинина в ответ на провоцируемую норадреналином потребность в оксиде азота.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00951.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Гилинский МА, Латышева ТВ, Семенова ЛП. Определение катехоламинов, серотонина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты в одной пробе крови // Клин. лаб. диагностика. 2007. № 6. С. 25–28.
2. Гилинский МА. Асимметричный диметиларгинин: метаболизм, аргининовый парадокс, патофизиология // Успехи физиол. наук. 2007. Т. 38. № 3. С. 21–39.
3. Гилинский МА, Анохин СИ, Зеунова НА и др. Моноамины крови при хронической почечной недостаточности: эффект гемодиализа // Нефрология и диализ. 2009. Т. 11. № 4. С. 310–313.
4. Сидельников ЮН, Сиворакиа ГА. Концентрация серотонина в крови больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Клин. лаб. диагностика. 1996. № 5. С. 21–22.
5. Федорченко ЮЛ, Давидович ИМ. Динамика общего, свободного и тромбоцитарного серотонина в плазме крови больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом // Клиническая медицина. 1990. Т. 68. № 6. С. 62–64.
6. Al Banbaabouchi M, Marescau B, Possemiers I et al. NG, NG-Dimethylarginine and NG, N'G-dimethylarginine in renal insufficiency // Pflugers Arch – Eur. J. Physiol. 2000. Vol. 439. № 5. P. 524–531.
7. Barisić I, Pivac N, Mićk-Seler D et al. Comorbid depression and platelet serotonin in hemodialysis patients // Nephrol. Clin. Pract. 2004. Vol. 96. № 1. P. 10–14.
8. Böger RH, Endres HG, Schwedhelm E et al. Asymmetric dimethylarginine as an independent risk marker for mortality in ambulatory patients with peripheral arterial disease // J. Intern. Med. 2011. Vol. 269. № 3. P. 349–361.

9. Böger RH, Schwedhelm E, Maas R. *et al.* ADMA and oxidative stress may relate to the progression of renal disease: rationale and design of the VIVALDI study // *Vasc. Med.* 2005. Vol. 10. Suppl 1. P. S97–S102.
10. Böger RH, Zoccali C. ADMA: a novel risk factor that explains excess cardiovascular event rate in patients with end-stage renal disease // *Atheroscler. Suppl.* 2003. Vol. 4. № 4. P. 23–28.
11. Brewster U.C., Ciampi M.A., Abu-Alfa A.K. *et al.* Addition of sertraline to other therapies to reduce dialysis-associated hypotension // *Nephrology (Carlton)*, 2003. Vol. 8 (6). P. 296–301.
12. Borgdorff P., Fekkes D., Tangelder G.J. Hypotension caused by extracorporeal circulation: serotonin from pump-activated platelets triggers nitric oxide release // *Circulation*, 2002. Vol. 106, № 20. P. 2588–2593.
13. Brunini T.M., Roberts N.B., Yaqoob M.M. *et al.* Activation of l-arginine transport in undialysed chronic renal failure and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006. Vol. 33. P. 114–118.
14. Cooke J.P. Asymmetrical dimethylarginine the uber marker? // *Circulation*. 2004. Vol. 109. P. 1813–1819.
15. de Jong S., Teerlink T. Analysis of asymmetric dimethylarginine in plasma using a monolithic column // *Analyt. Biochem.* 2006. Vol. 353. P. 287–289.
16. Fleck C., Schweitzer F., Karge E. *et al.* Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases // *Clin. Chim. Acta.* 2003. Vol. 336. № (1–2). P. 1–12.
17. Kielstein J.T., Buger RH, Bode-Boger S.M. *et al.* Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease // *J. Am. Soc. Nephrol.* 1999. Vol. 10. № 3. P. 594–600.
18. Kielstein J.T., Simmel S., Bode-Boger S.M. *et al.* Subpressor dose asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition // *Kidney Blood Press. Res.* 2004. Vol. 27. P. 143–147.
19. Kielstein J.T., Zoccali C. Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? // *Am. J. Kidney Dis.* 2005. Vol. 46. P. 186–202.
20. Kimmel P.L., Cukor D., Cohen S.D. *et al.* Depression in end-stage renal disease patients: a critical review // *Adv. Chronic Kidney Dis.*, 2007. Vol. 14. № 4. P. 328–334.
21. Lechin F., van der Dijs B., Lechin A.E. Circulating serotonin, catecholamines, and central nervous system circuitry related to some cardiorespiratory, vascular, and hematological disorders // *J. of Appl. Res.* 2005. Vol. 5. No. 4. P. 605–621.
22. Lindner A., Charra B., Sherrard D.J. *et al.* Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis // *N. Engl. J. Med.* 1974. Vol. 290. P. 697–701.
23. MacAllister R.J., Rambaousek M.H., Vallance P. *et al.* Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure // *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996. Vol. 11. P. 2449–2452.
24. Mendes Ribeiro A.C., Roberts N.B., Lane C. *et al.* Accumulation of the endogenous l-arginine analogue NG-monomethyl-arginine in end stage renal failure patients on regular haemodialysis // *Exp. Physiol.* 1996. Vol. 81. P. 475–481.
25. Picard M., Olichon D., Gombert J. Determination of serotonin in plasma by liquid chromatography with electrochemical detection // *J. Chromatogr.* 1985. Vol. 341. P. 445–451.
26. Prados P., Matsunaga H., Mori T. *et al.* Changes of plasma L-arginine levels in spontaneously hypertensive rats under induced hypotension // *Biomed. Chromatogr.* 1999. Vol. 13. P. 27–32.
27. Ravani P., Tripepi G., Malberti F. *et al.* Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2005. Vol. 16. P. 2449–2455.
28. Sarnak M.J., Levey A.S., Schoolwerth A.C. *et al.* Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention // *Circulation*. 2003. Vol. 108. P. 2154–2169.
29. Schmidt R.J., Baylis C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease // *Kidney Int.* 2000. Vol. 58. № 3. P. 1261–1266.
30. Schwedhelm E., Buger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease // *Nat. Rev. Nephrol.* 2011. Vol. 7. № 5. P. 275–285.
31. Sebekova K., Spustova V., Opatrný K. Jr. *et al.* Serotonin and 5-hydroxyindole-acetic acid // *Bratisl. Lek. Listy.* 2001. Vol. 102. № 8. P. 351–356.
32. Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC // *Meth. Mol. Med.* 2002. Vol. 108. P. 263–274.
33. Xiao S., Wagner L., Schmidt R.J. *et al.* Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease // *Kidney Int.* 2001. Vol. 59. P. 1466–1472.
34. Zoccali C., Bode-Boger S.M., Mallamaci F. *et al.* Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study // *Lancet.* 2001. Vol. 358. P. 2113–2117.
35. Zoccali C., Mallamaci F., Tripepi G. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a cardiovascular risk factor in end-stage renal disease (ESRD) // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006. Vol. 62. Suppl. 13. P. 131–135.
36. Zoccali C., Mallamaci F., Parlongo S. *et al.* Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease // *Circulation.* 2002. Vol. 105. P. 1354–1359.

Дата получения статьи: 31.10.11

Дата принятия к печати: 13.05.12