

УДК 545.3:616.61-78

## Изучение динамики изменения концентрации ацетат-ионов в крови пациентов в процессе гемодиализа с применением метода капиллярного электрофореза

З. М. УНАРОКОВ<sup>1</sup>, О. В. ШУВАЕВА<sup>2</sup>, Т. В. МУХОЕДОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. Е. Н. Мешалкина, ул. Речкуновская, 15, Новосибирск 630055 (Россия)

E-mail: jovi33@rambler.ru

<sup>2</sup>Институт неорганической химии им. А. В. Николаева Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск 630090 (Россия)

(Поступила 03.07.12; после доработки 13.08.12)

### Аннотация

Впервые исследовано содержание ацетат-иона в крови у больных после кардиохирургических операций в процессе гемодиализа с использованием различных диализирующих растворов. Методом капиллярного электрофореза установлено, что в случае, если в бикарбонатном диализате присутствует небольшое количество ацетат-иона (3 ммоль/л), его концентрация в крови возрастает до 12 раз, а это повышает риск сердечно-сосудистой нестабильности во время гемодиализа.

**Ключевые слова:** капиллярный электрофорез, ацетат-ион, безацетатный диализ, SLED

### ВВЕДЕНИЕ

Ацетатный буферный раствор, применяемый в качестве компонента диализных систем, получил широкое применение с середины 1960-х годов благодаря хорошей растворимости и стабильности в концентратах диализирующих растворов, а также быстрой трансформации в организме с образованием эквивалентов оснований. Однако высокая концентрация ацетат-иона в диализате (35–40 ммоль/л) и пониженная скорость его метаболизма у больных с почечными дисфункциями приводят к накоплению вещества в организме. Согласно литературным данным, накопление ацетат-иона в крови индуцирует гипоксию с последующей активацией провоспалительного цитокинового каскада, активацию цикло- и липооксигеназы, синтез простагландинов и тромбксана. Клиническими проявлениями накопления ацетат-иона во время диализа могут быть такие осложнения, как сни-

жение артериального давления (АД) и нарушения сердечного ритма [1–3].

В настоящее время в связи с многочисленными осложнениями ацетатный буфер в составе диализата стали заменять на более физиологичный бикарбонатный буфер. Однако стандартный бикарбонатный диализат также содержит некоторое количество ацетат-иона (от 3 до 7 ммоль/л), необходимого для поддержания нужной величины рН диализирующего раствора ( $\text{pH} \leq 7.4$ ) для предотвращения осаждения карбоната кальция.

Авторы работ [4–6] показали, что для ряда пациентов такая концентрация ацетат-иона в диализате может провоцировать увеличение его содержания в крови в 4–10 раз по отношению к норме. Однако подобные исследования проводились только в отношении больных с терминальной хронической болезнью почек (тХБП). Аналогичных данных для больных с острым почечным повреждением (ОПП), в том числе после кардиохирургичес-

ких вмешательств, в литературе нет. Между тем эти категории больных имеют принципиальные различия: послеоперационный период у кардиохирургических больных с ОПП нередко сопровождается сердечной недостаточностью, выраженными нарушениями микроциркуляции крови, снижением скорости обменных процессов, т. е. факторами, способствующими накоплению ацетат-иона во время гемодиализа.

Современные диализные технологии, такие как SLED (Sustained Low-Efficiency Dialysis – продленный низкоэффективный диализ), предполагают проведение терапии в низкоинтенсивном режиме, т. е. с меньшей скоростью подачи диализирующей жидкости (6–8 л/ч) и, соответственно, меньшим поступлением ацетат-ионов в кровь (18–54 ммоль/ч). Учитывая тот факт, что в норме скорость метаболизма ацетат-ионов достаточно высокая (200–300 ммоль/ч), накопление их в организме в принципе не должно происходить.

Однако проведенные нами пилотные исследования показали, что при использовании ацетатсодержащего бикарбонатного диализата эпизоды снижения АД и нарушений сердечного ритма развивались значительно чаще, чем при применении безацетатного диализата, а это косвенно может указывать на интрадиализную кумуляцию ацетат-иона в крови [7]. Для подтверждения этой гипотезы потребовалось количественное определение уровня ацетата во время проведения сеансов SLED в динамике.

Предшествующие исследования динамики метаболизма ацетат-ионов в крови показали, что в норме их физиологическая концентрация достаточно низкая (0–100 мкмоль/л), однако во время диализа она может достигать 2800 мкмоль/л [8, 9]. Иными словами, интрадиализные изменения уровня ацетат-иона в крови происходят в достаточно широком диапазоне концентраций, поэтому для проведения исследований в данном направлении необходимо применять методы анализа, обеспечивающие возможность селективного определения ацетат-иона в биопробах на уровне концентраций  $\leq 100$  мкмоль/л.

К сожалению, число опубликованных работ по определению ацетат-иона в биосубстратах весьма ограничено. В работе [10] применялся ацетил-коэнзим-А-синтезный ме-

тод со ссылкой на коммерческую разработку компании BioAssay Systems, позволяющий проводить определение ацетат-иона в диапазоне концентраций 200–20000 мкмоль/л в варианте фотометрического детектирования или 130–2000 мкмоль/л в варианте флуориметрического детектирования. Более ранние работы, основанные на использовании метода газовой хроматографии, также обеспечивают чувствительность лишь на уровне 200 мкмоль/л [11, 12]. Авторы [13] применяли ионно-эксклюзионную хроматографию для определения ряда анионов в слюне, однако присутствие в анализируемых образцах ацетат-иона установить не удалось, поэтому возможность его определения была подтверждена на модельных растворах с концентрацией аналита не ниже 220 мкмоль/л. Наиболее чувствительный и достаточно трудоемкий метод определения описан в работе [9] и основан на предварительном выделении ацетат-иона путем вакуумной дистилляции с последующим газохроматографическим определением его содержания на уровне 26 мкмоль/л.

Таким образом, вопрос о методическом обеспечении исследований, связанных с изучением динамики изменения концентрации ацетат-иона в биосубстратах в различных процессах, имеет актуальное значение.

В рамках настоящей работы для определения ацетат-иона разработана методика с применением метода капиллярного электрофореза (КЭ). Данный метод относится к методам сепарационного анализа, поэтому его применение для исследования сложных систем, таких как сыворотка крови, представляется вполне обоснованным.

Принцип метода КЭ состоит в том, что в растворе, находящемся в узком кварцевом капилляре ( $d \leq 100$  мкм), под действием приложенного электрического поля происходит, с одной стороны, движение заряженных частиц, а с другой, – возникает пассивный поток жидкости. В результате проба разделяется на индивидуальные компоненты, так как параметры электромиграции (электрофоретическая подвижность) специфичны для каждого сорта заряженных частиц. Для детектирования определяемых компонентов пробы в потоке чаще всего применяют прямую (для аналитов с высокими коэффициентами моляр-

ного поглощения) или косвенную фотометрию (для непоглощающих компонентов) [14].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение ацетат-иона в пробах сыворотки крови проводили на установке КЭ “Капель 105”, снабженной кварцевым капилляром (диаметр 75 мкм, общая длина 70 см, длина от входа до детектора 50 см) с УФ-детектором на длине волны 250 нм. В качестве разделительного электролита применяли раствор, содержащий хромат-ион (поглощающий анион), цетилтриметиламмония бромид (катионное поверхностно-активное вещество для обращения электроосмотического потока) и диэтаноламин для поддержания реакции среды на уровне рН 9.0.

Ввод анализируемой пробы в капилляр осуществляли путем приложения внешнего давления к резервуару, в который погружен входной конец капилляра (пневматический ввод: давление 30 мбар, продолжительность 10 с). Рабочее напряжение в процессе анализа составляло 25 кВ, для снижения продолжительности процедуры анализ проводили с приложением давления 50 мбар. Схема установки представлена на рис. 1.

#### Подготовка проб к анализу

При анализе проб сложного состава, к которым относятся биосубстраты человека и животных, необходимо устранить влияние

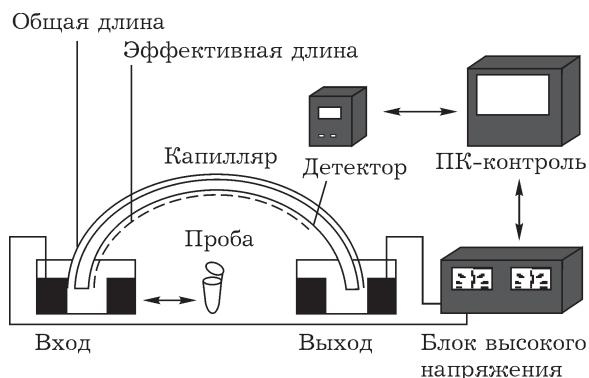


Рис. 1. Схема установки капиллярного электрофореза.

белковой компоненты. Наличие ее в пробе приводит к невоспроизводимым результатам анализа вследствие блокирования стенок капилляра, за счет чего от ввода к вводу пробы изменяется время миграции и снижается эффективность разделения компонентов пробы. Для устранения данного эффекта пробы, как правило, разбавляют, однако подобный подход, с одной стороны, приводит к потере чувствительности, а с другой, – не обеспечивает полного устранения влияния матрицы на результаты анализа.

В рамках проводимых исследований нами предложена следующая процедура пробоподготовки: непосредственно перед анализом пробы размораживают в закрытом сосуде при комнатной температуре, затем отбирают аликвоту 0.25 мл, добавляют к ней 0.25 мл ацетонитрила для осаждения белков. Затем пробу центрифугируют при 900g в течение 10 мин. В другую пробирку отбирают 100 мкл супернатанта, добавляют к нему 100 мкл ацетонитрила, перемешивают и подвергают процедуре анализа методом КЭ.

Подобный подход обеспечивал удаление белковой компоненты пробы и в то же время позволял значительно снизить ее электрическую проводимость за счет разбавления вводимой в капилляр пробы органическим растворителем с низкой диэлектрической проницаемостью. Это создает наиболее благоприятные условия для проведения концентрирования непосредственно в капилляре (стэкинга) и снижения предела обнаружения аналита [14].

Другая особенность объекта исследования – высокий уровень содержания хлорид-иона (96–106 ммоль/л), что в 1000 раз превышает концентрацию определяемого компонента и в принципе может приводить к наложению сигнала аналита и макрокомпонента (хлорид-иона). Для преодоления подобного эффекта условия анализа оптимизированы путем выбора напряжения, давления в процессе разделения, а также объема вводимой пробы. В результате достигнуто вполне удовлетворительное разрешение сигналов аналита и мешающего компонента (рис. 2).

Отсутствие потерь ацетат-иона в процессе осаждения белков сыворотки крови подтверждено результатами эксперимента “введено – найдено”, в ходе которого к пробе до стадии

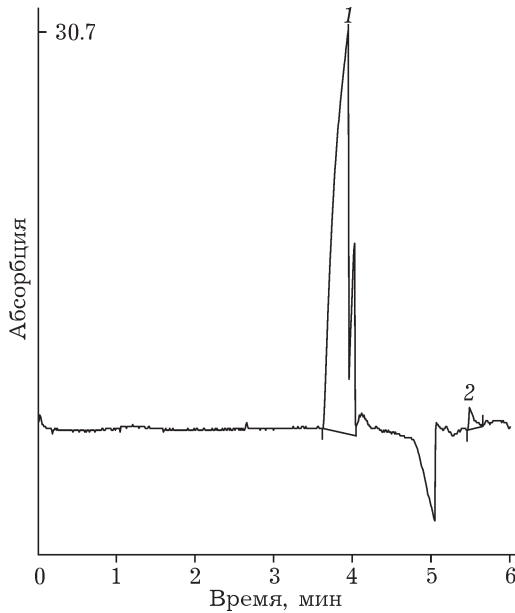


Рис. 2. Электрофореграмма пробы сыворотки крови: 1 – хлорид-ион, 2 – ацетат-ион. Условия анализа: буфер хроматный, с добавкой диэтанолamina и цетилтриметилamмония гидроксида; капилляр:  $L_{эфф}/L_{общ} = 50/60$  см, внутренний диаметр 75 мкм; ввод пробы: 30 мбар · 10 с; напряжение 25 кВ; давление в процессе анализа 50 мбар; детектирование:  $\lambda = 254$  нм, косвенное.

осаждения добавляли известное количество ацетат-иона в виде раствора. Показано (табл. 1), что в пределах погрешности анализа результаты эксперимента “введено – найдено” удовлетворительно согласуются.

На данном этапе исследований результаты эксперимента “введено – найдено” подтверждают правильность разработанной методики, так как метод КЭ основан на разделении компонентов пробы. Предел обнаруже-

ТАБЛИЦА 1

Результаты эксперимента “введено – найдено”, мкмоль/л (содержание ацетат-иона в усредненной пробе сыворотки крови ( $65 \pm 7$ ) мкмоль/л)

Номер опыта	Введено	Найдено	Найдено с учетом содержания в пробе
1	40	102±10	62±10
2	40	100±10	60±10
3	40	110±12	70±12
4	100	170±17	70±17
5	100	164±16	64±16
6	100	172±17	72±17
7	200	260±26	60±26
8	200	265±27	65±27
9	200	258±26	58±26

ния методики оценивали по величине аналитического сигнала ацетат-иона (площадь пика), превышающего дисперсию фонового сигнала в три раза. Установлено, что предел обнаружения ацетат-иона в сыворотке крови по данной методике соответствует 20 мкмоль/л.

Типичная электрофореграмма сыворотки крови приведена на рис. 2.

Случайную погрешность (относительное стандартное отклонение) определения ацетат-иона в пробах сыворотки крови оценивали как результат статистической обработки выборки из 10 параллельных определений для пробы усредненного состава (доверительная вероятность 0.95). Показано, что она не превышает 10 %.

### Объекты исследования

Обследовали 70 пациентов с ОПП после сердечно-сосудистых операций, пролеченных в послеоперационном периоде с использованием технологии SLED. В обследованную когорту вошли 46 мужчин и 34 женщины, в возрасте от 23 до 81 лет (средний возраст пациентов составлял  $(58.7 \pm 11.7)$  лет).

В зависимости от вида применяемого диализирующего раствора больных распределяли на две группы. В 1-й группе ( $n = 35$ ) SLED проводили с применением стандартного бикарбонатного диализата, содержащего 3 ммоль/л ацетат-иона.

Во 2-й группе ( $n = 35$ ) SLED проводили с использованием безацетатного диализата “Кребсол”, в котором ацетат заменяли раствором соляной кислоты (3 ммоль/л).

Контрольную группу 3а составили 14 больных в возрасте от 38 до 74 лет (средний возраст  $(52.6 \pm 1.3)$  лет) с неосложненным послеоперационным течением, которых обследовали в первые сутки после сердечно-сосудистых операций. В группу 3б было включено 15 здоровых добровольцев.

У участников контрольных групп, не получавших лечение, определяли базальный уровень ацетат-иона в сыворотке крови.

В группах больных, пролеченных с использованием технологии SLED с различными диализирующими растворами, концентрацию ацетат-иона в крови определяли трижды: перед началом терапии, через 1 ч после начала сеанса и в конце процедуры.

ТАБЛИЦА 2

Сравнительная концентрация ацетат-иона крови в исследуемых группах

Группы	Число наблюдений	Концентрация ацетат-иона крови, мкмоль/л		
		Медиана	25–75 %	Ранг
Здоровые добровольцы	15	40	30–80	20–160
Больные, неосложненный послеоперационный период	14	45	30–60	20–100
Больные, пролеченные методом SLED	70	100*	40–330	20–540

\* $p < 0.01$  по сравнению с контрольными группами.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ Statistica (7.0 for Windows). Результаты представлены как среднее и стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ), медиана, 25-й и 75-й процентиля. Статистически значимыми считались различия данных при  $p < 0.05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучено сравнительное влияние SLED с различными диализирующими растворами на динамику ацетатемии во время лечения у 70 пациентов. Из данных табл. 2 видно, что у пациентов из контрольных групп уровень ацетат-иона крови находится в пределах физиологической нормы.

В исследованной выборке больных с ОПП исходный преддиализный уровень ацетат-иона был повышен в среднем в 2.5 раза по сравнению с контрольными группами. При этом в 40 случаях (57 %) концентрация ацетат-иона соответствовала норме, в остальных (43 %) – превышала норму (от 120 до 540 мкмоль/л). Таким

образом, практически у половины больных с ОПП наблюдалось исходное снижение скорости метаболизма ацетат-иона.

Результаты исследования динамики ацетатемии во время сеанса SLED приведены в табл. 3.

Видно, что у больных, пролеченных с использованием технологии SLED с безацетатным диализатом, уровень ацетат-иона в крови практически не изменился во время сеанса. Напротив, в группе, пролеченной с использованием SLED с ацетатсодержащим бикарбонатным диализатом, уже через 1 ч после начала диализа произошло увеличение концентрации ацетат-иона в среднем в 1.5 раза. К моменту окончания сеанса SLED концентрация ацетат-иона выросла в среднем в 5.6 раза по сравнению с этапом до лечения и до 12 раз по сравнению с контрольными группами.

Таким образом, несмотря на низкую концентрацию ацетат-иона (3 мкмоль/л) в диализирующем растворе и низкоинтенсивные параметры диализной терапии, повышение уровня ацетат-иона в крови было клинически значимым. При этом степень повышения уровня

ТАБЛИЦА 3

Сравнительная динамика ацетатемии во время SLED с разными вариантами диализата ( $n = 35$ )

Величины	Содержание ацетат-иона, мкмоль/л					
	SLED с ацетатсодержащим бикарбонатным диализатом			SLED с безацетатным диализатом		
	До лечения	1 ч	После лечения	До лечения	1 ч	После лечения
Медиана	100*	150*	560*	100	90	90
25–75 %	60–240	80–400	100–980	30–360	30–300	40–230
Ранг	20–460	20–1300	20–2100	20–540	20–600	20–520

\* $p < 0.01$ .



ацетат-иона и диапазон колебаний его концентрации (максимально до 2100 мкмоль/л) в случае использования ацетатсодержащего бикарбонатного диализата согласуются с литературными данными в группах больных с тХБП, пролеченных гемодиализом с ацетатсодержащим бикарбонатным диализатом [5, 15, 16].

В нашем исследовании рассмотрены группы больных с ОПП только кардиохирургического профиля, поэтому для подтверждения полученных результатов необходимы дальнейшие исследования, в том числе других категорий больных, нуждающихся в проведении диализной терапии.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало перспективность применения метода КЭ для определения концентрации ацетат-иона в крови. Данный метод показал высокую разрешающую способность в широком диапазоне значений, в том числе при определении низких концентраций ацетат-иона. При этом погрешность измерений была невысокой и не влияла на клиническую интерпретацию полученных данных. В то же время метод КЭ отличается доступностью, относительно невысокой стоимостью одного определения и малым временем анализа.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Noris M, Todeschini M, Casiraghi F, Roccatello D, Martina G, Minetti L, Imberti B, Gaspari F, Atti M, Remuzzi G. // *Am. J. Kidney Dis.* 1998. Vol. 32(1). P. 115–124.
- 2 Anderson J, Briefel G, Jones J. M, Ryu J. H, McGuire M, Pyo Yun Y. // *Kidney Int.* 1991. Vol. 40. P. 1110–1117.
- 3 Severy S, Ciandrini A, Grandi E, Cavalcanti S, Bini S, Badiali F, Gattiani A, Cagnoli L. // *Hemodialysis Int.* 2006. Vol. 10 (3). P. 287–293.
- 4 Selby N. M., Fluck R. J., Taal M. W., McIntyre C. W. // *ASAIO J.* 2006. Vol. 52(1). P. 62–69.
- 5 Coll E, Pérez-García R., Martín de Francisco A. L., Galcerán J., García-Osuna R., Martín-Malo A., Martínez-Castelao A., Sánchez B., Llopis R., Álvarez de Lara M. A. // *Kidney Int.* 2009. Vol. 60. P. 777–785.
- 6 Ding F, Ahrenholz P, Winkler R. E., Ramlow W., Tiess M., Michelsen A., Pätow W. // *Artif. Organs.* 2002. Vol. 26(2). P. 169–180.
- 7 Mukhoedova T., Unarokov Z. // *NDT Plus.* 2010. Vol. 3(suppl 3). P. iii367: doi: 10.1093/ndtplus/sfq139.
- 8 Tolchin N., Roberts J. L., Hayashi J., Lewis E. J. // *Kidney Int.* 1977. Vol. 11. P. 366–378.
- 9 Tollinger C. D., Vreman H. J., Weiner M. W. // *Clin. Chem.* 1979. Vol. 25/10. P. 1787–1790.
- 10 Fournier G., Potier J., Thebaud H.E., Majdalani G. // *Artif. Organs.* 1998. Vol. 22. P. 608–613.
- 11 Laker M. F., Mansell M. A. // *Ann. Clin. Biochem.* 1978. Vol. 15(4). P. 228–232.
- 12 Desch G., Descomps B. // *Clin. Chim. Acta.* 1977. Vol. 76(2). P. 193–204.
- 13 Chen Z.-F., Darvell B. W., Leung V. W.-H. // *Archives of Oral Biology.* 2004. Vol. 49. P. 855–862.
- 14 Энгельгардт X. Руководство по капиллярному электрофорезу. / Ред. А. М. Волощук. М: Научный совет РАН по хроматографии, 1996.
- 15 Amore A., Cirina P., Mitola S., Peruzzi L., Bonaudo R., Gianoglio B., Coppo R. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997. Vol. 9. P. 1431–1436.
- 16 Pizzarelli F., Cerrai T., Dattolo P., Ferro G. // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006. Vol. 21. P. 1648–1651.