

БИОХИМИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С.

УРОВЕНЬ ГОМОАРГИНИНА И БАЛАНС МЕТИОНИН-ГОМОЦИСТЕИН У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»
Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия

Согласно последним данным, уровень гомоаргинина (hArg) плазмы по прогностической значимости в отношении прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний может превосходить натрийуретические пептиды и другие известные маркеры. Недостаток данных о связях уровней hArg с уровнями других метаболитов затрудняет понимание его роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Проведена оценка связей уровней hArg и других аминокислот, включая метионин (Met) и гомоцистеин (Гци) и их соотношения у пациентов с ишемической болезнью сердца. В исследование включены 74 пациента с ишемической болезнью сердца (57 мужчин и 17 женщин) в возрасте 62 (57 – 67) лет перед плановой операцией аортокоронарного шунтирования и 27 близких по возрасту здоровых лиц. У пациентов уровень hArg был почти в 2 раза ниже ($p < 0,05$), чем у здоровых лиц и у 50% - ниже 1,4 мкМ. Понижению уровня hArg соответствовало статистически значимое снижение ($p = 0,0025$) соотношения Met/оГци. Это соотношение не коррелировало с уровнем глюкозы или индексом массы тела. По отдельности уровни Met и оГци коррелировали с уровнем hArg с меньшей статистической значимостью. В подгруппе с уровнем hArg выше 2,1 мкМ отмечена меньшая частота инфарктов миокарда. Таким образом, у пациентов с ишемической болезнью сердца пониженный уровень hArg связан с нарушением обмена серосодержащих аминокислот, участвующих в процессах трансметилирования. Соотношение Met/оГци, тесно коррелируя с уровнем hArg, по-видимому, обнаруживает связь реакций образования креатина и трансметилирования, выделяя когорту пациентов с наиболее глубокими и опасными изменениями тканевого метаболизма.

Ключевые слова: гомоаргинин; метионин; гомоцистеин; аминокислоты; ишемическая болезнь сердца.

Для цитирования: Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С., Полушин Ю.С. Уровень гомоаргинина и баланс метионин-гомоцистеин у пациентов с ишемической болезнью сердца. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 516-524. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-516-524>

Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S.

HOMOARGININE LEVEL AND METHIONINE-HOMOCYSTEINE BALANCE IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint-Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022, St. Petersburg, Russia

The level of homoarginine (hArg) in terms of prognostic significance may exceed the natriuretic peptides and other well-known markers according to the latest data about the progression of cardiovascular diseases. The lack of data on the association of hArg levels with levels of other metabolites makes it difficult to understand its role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Relationships of hArg and other amino acids, including methionine (Met) and total homocysteine (tHcy), and their ratio in patients with ischemic heart disease were evaluated. The study included 74 patients with coronary heart disease (57 men and 17 women) aged 62 (57 - 67) years before coronary artery bypass surgery and 27 healthy people of similar age. In patients, the level of hArg was almost 2 times lower ($p < 0.05$) than in healthy individuals and rates lower than 1.4 μM were in half of them. The statistically significant decrease ($p = 0.0025$) of the Met/tHcy ratio corresponded to a decrease in the level of hArg. This ratio did not correlate with glucose level or body mass index. Less statistical significance of hArg correlation with levels of Met or tHcy separately was observed. In the subgroup of patients with hArg level above 2.1 μM , a lower incidence of myocardial infarction was noted. Thus, a low hArg level is associated with impaired metabolism of sulfur-containing amino acids involved in transmethylation reactions, in patients with ischemic heart disease. The Met/tHcy ratio, closely correlating with the level of hArg, apparently reveals a link between the reactions of creatine formation and transmethylation, highlighting a cohort of patients with the most profound and dangerous changes in tissue metabolism.

Key words: homoarginine, methionine; total homocysteine; amino acids; ischemic heart disease.

For citation: Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S., Polushin Yu.S. Homoarginine level and methionine-homocysteine balance in patients with ischemic heart disease. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (9): 516-524 (in Russ.)

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-516-524>

Acknowledgment. The authors would like to express their gratitude for organizational and information support to the Blood transfusion Department of Pavlov First Saint Petersburg State Medical University.

For correspondence: Zhloba A.A., Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of Biochemistry Department of Scientific and Educational Institute of Biomedicine; e-mail: zhlobaaa@1spbgmu.ru

Information about authors:

Zhloba A.A., <http://orcid.org/0000-0003-0605-7617>

Subbotina T.F., <http://orcid.org/0000-0002-2278-8391>

Polushin Yu.S. <https://orcid.org/0000-0002-6313-5856>

Conflict of interest. *The authors declare no conflict of interest.*

Acknowledgment. *The research was carried out within the Ministry of Health framework of the Russian Federation.*

Received 20.05.2019
Accepted 25.06.2019

Введение. В настоящее время известны метаболомные прогностические маркеры угрозы ишемического инсульта и инфаркта миокарда, к числу которых относится уровень гомоаргинина (гАрг) [1, 2]. Последние данные указывают на то, что этот показатель по прогностической значимости в отношении прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний может превосходить натрийуретические пептиды, тропонины, С-реактивный белок, сывороточный амилоид А, неоптерин, асимметричный и симметричный диметиларгинины [1]. Понижение уровня гАрг в плазме менее 1,4 мкМ приводит к появлению статистически значимого риска острых ишемических событий с неблагоприятными исходами с встречаемостью в 25%, а дальнейшее снижение гАрг ниже 0,84 мкМ удваивает этот риск [1, 3, 4]. В предыдущем сообщении нами показано существенное снижение данного метаболита у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) [5]. К настоящему времени показано, что среди пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями снижение гАрг обнаруживается не у всех. Так, среди пациентов с признаками стенокардии или с нарушениями сердечного ритма отмечена слабая связь данных состояний с пониженными уровнями гАрг [6]. В статье, опубликованной нами ранее, приведены данные о том, что отсутствие этой связи может быть обусловлено высокими уровнями аргинина и лизина - аминокислот, высвобождающихся в больших количествах при активации фибринолиза [5, 7]. Можно ожидать, что гАрг, как и другие известные метаболомные маркеры, приобретает большую диагностическую значимость, если рассматривается в группе с другими метаболитами. Недостаток данных о связях уровней гАрг с уровнями других метаболитов затрудняет понимание его роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний. Метаболическое происхождение гАрг известно, но не изучены метаболомные изменения, которые тесно связаны со снижением его уровня. Сам гАрг является менее подходящим, чем аргинин, субстратом эндотелиальной NO-синтазы. В настоящее время общепринятой точкой зрения заключается в том, что гАрг в эндотелиальных клетках, сильно ингибируя аргиназы, повышает содержание внутриклеточного аргинина и тем самым активность эндотелиальной NO-синтазы, т.е. способствует вазодилатации [4]. Известно, что атеросклеротическое поражение артерий, в том числе, коронарных, сопряжено с многолетним отклонением в потреблении, метаболизме и эндогенном транспорте липидов, что может быть описано, как «нарушение эндоэкологии» с системными устойчивыми нарушениями других звеньев метаболизма [8, 9].

В этом аспекте связи уровня гАрг с регуляцией и моделированием клеточного метаболизма изучены не-

достаточно. Реакция, за счет которой образуется гАрг, катализируется аргинин:глицинамидинотрансферазой (АГАТ) и одновременно является ключевой реакцией биосинтеза креатина. Поэтому падение уровня гАрг в кровотоке может отражать интенсивность метаболомных процессов в тканях, богатых креатинфосфатом. Из важных устойчивых сдвигов на уровне организма отмечают существенные изменения соотношения мышечной массы и жировой ткани с превалированием последней. Из интенсивно используемых в азотистом обмене исходных субстратов для обновления тканей в настоящее время достаточно изучены колебания уровней аминокислот в крови. Особенно значительные сдвиги при сердечно-сосудистых заболеваниях наблюдаются со стороны метионина (Мет), группы разветвленных аминокислот валина (Вал), изолейцина (Иле), лейцина (Лей), а также глутамина (Глн) и глутамата (Глу) [10]. Мет, как незаменимая аминокислота, необходим в качестве нутриента во всех возрастных группах независимо от состояния организма. Недостаток Мет и пониженная концентрация его в крови ведут к гипометилированию, нарушению инициации и регуляции синтеза белков, а также низкомолекулярных метаболитов, участвующих в углеводном и липидном обменах [11, 12]. Содержание Мет в плазме или сыворотке крови по данным ведущих руководств по клинической лабораторной диагностике может колебаться в очень широких пределах от 6 до 40 мкМ [13]. При рассмотрении же однородных групп пациентов или динамики Мет у отдельных пациентов уровень этого показателя в плазме крови, взятой натощак, группируется в узком диапазоне концентраций [14-16]. Несмотря на значительные межлабораторные и географические различия в референтных уровнях Мет и других аминокислот, направления их сдвигов в патологических условиях оказываются сопоставимо близкими. Обычно уровень аминокислот, за исключением уровня серина (Сер), во всех возрастных группах на 5 - 15% выше у мужчин. В частности, у мужчин уровень Мет и общего гомоцистеина (оГци) несколько выше, чем у женщин репродуктивного возраста. У последних реметилирование гомоцистеина (Гци) с образованием Мет протекает более эффективно [17]. В возрастном и географическом аспектах также можно отметить некоторые особенности в содержании аминокислот, включая Мет [18, 19]. Уровень Мет в крови возрастает после поступления белков, богатых этой аминокислотой, включая казеин молочных продуктов и яичный альбумин. Однако в промежутках между приемами пищи уровень Мет быстро возвращается к исходному благодаря процессам трансметилирования и последующей утилизации образующегося Гци в цистатиониновом пути [20, 21]. Исследования с при-

влечением взрослых лиц показали отсутствие неблагоприятных последствий умеренных колебаний в потреблении Мет с пищей, но потребление более чем в 5 раз превышающее норму приводило к повышению уровня оГци. Этот эффект потребления избытка Мет смягчался добавками в рацион витаминов В₆, В₁₂, С и фолиевой кислоты [22]. Следует отметить, что долгосрочные последствия избытка Мет в рационе до настоящего времени не оценены, так как подобные исследования заняли бы слишком большие промежутки времени. Модельные опыты, например, показывают, что постоянное употребление продуктов богатых казеином и, соответственно, Мет, таких как сыр, может способствовать увеличению уровня оГци [23]. Таким образом, уровень Мет связан с генетическими факторами, образом жизни, пищевыми предпочтениями и поэтому определяется не только наличием тех или иных патологических состояний, полом и возрастом. Как справедливо отмечают в различных исследованиях, при определении отклонений от референтного уровня Мет у пациентов в конкретном регионе необходимо опираться на значения показателя в группе здоровых лиц с более или менее близкими параметрами образа жизни.

У пациентов с ИБС, часть которых имела в анамнезе ишемический инсульт, наблюдалось повышение уровня цистатионина - продукта обмена Мет и Гци [24]. У этих пациентов уровень цистатионина обнаруживал сильную связь с ишемическим инсультом, что свидетельствует об активации цистатионинового пути для удаления избытка Мет. В другом проспективном исследовании с наблюдением за 4156 пациентами с ИБС среди участников с повышенным уровнем апоВ или ЛПНП-холестерина обнаружено, что пониженные уровни Мет в плазме связаны с повышенным риском развития инфаркта миокарда [25]. Уровни Мет и оГци не часто одновременно используют для характеристики пациентов. Несмотря на очевидную взаимосвязь этих серосодержащих аминокислот, их совместное определение и анализ связей с другими метаболическими изменениями, наблюдаемыми при сердечно-сосудистых заболеваниях, не проведены. Нам представляется важным изучение сдвигов в содержании этих аминокислот и гАрг у пациентов с ИБС, у которых одновременно наблюдается снижение эффективности поступления энергетических ресурсов и нарушается обмен серосодержащих аминокислот.

Это, возможно, позволит установить или отклонить не только патогенетическую роль, но также возможное значение серосодержащих аминокислот для диагностической оценки ишемических состояний.

Настоящее исследование заключалось в определении уровней Мет, других аминокислот и соотношения Мет к оГци у пациентов с ишемической болезнью сердца и в соответствующей группе здоровых лиц с целью оценки связи этих сдвигов с уровнями прогностического показателя угрозы обострения ишемических состояний - гАрг.

Материал и методы. В исследование включены 74 пациента с ИБС (57 мужчин и 17 женщин) в возрасте 62 (57 – 67) лет, находившихся на стационарном лечении в клиниках ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова с августа 2014 по октябрь 2016 г. в связи с плановой операцией аортокоронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. Все пациенты имели много-сосудистое (у большинства трехсосудистое) поражение коронарного русла с необходимостью реваскуляризации,

хроническую сердечную недостаточность 3 функционального класса, (фракция выброса левого желудочка снижена, но не менее 50% от должного) и артериальную гипертензию, требующую медикаментозной коррекции.

Исследование было одобрено этическим комитетом ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова. Обязательным условием включения пациента в исследование являлось его информированное согласие. Критериями невключения являлись: отсутствие согласия пациента, поражение клапанного аппарата, перенесенный острый инфаркт миокарда (ОИМ) в предшествующие 6 недель, сахарный диабет, сердечная недостаточность с фракцией выброса левого желудочка менее 50%, хроническая болезнь почек > 3Б ст.

В среднем, фракция выброса левого желудочка у пациентов составила (61,5 ± 6,0)% должного. 39 пациентов (53%) имели острый инфаркт миокарда (ОИМ) в анамнезе. Только 12 пациентов (16%) имели нормальный индекс массы тела (ИМТ < 25 кг/м²). У 39 пациентов (53%) отмечалась избыточная масса тела, а у 23 (31%) – ожирение (ИМТ > 30 кг/м²). Распределение основных клинико-лабораторных показателей в зависимости от величины ИМТ представлено в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что достоверные различия у пациентов с нормальной массой тела и ожирением отмечается только по фибриногену: у лиц с ожирением он достоверно выше, хотя и находится в границах референтного диапазона. Группа пациентов в целом характеризуется тем, что основные биохимические показатели, как правило, не показывают значительных отклонений: глюкоза 5,3 (4,9 – 5,6) мМ, общий холестерин 4,2 (3,6 – 5,2) мМ, креатинин 84 (75 – 97) мкМ, мочевины 5,4 (4,7 – 6,2) мМ. Общий белок плазмы составлял 73 (70 – 75) г/л. Лишь уровень оГци у большинства пациентов был ближе к верхней границе референтного диапазона: 8,1 (6,4 – 10,5) мкМ, а у 15 пациентов (20%) превышал 12 мкМ. Фоновая терапия пациентов была представлена β-блокаторами (100% пациентов), ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (82%), анти-тромботическими препаратами различного механизма действия (85%), нитратами (53%), диуретиками (25%).

Венозную кровь для исследования получали из кубитальной вены после 12-часового голодания непосредственно перед операцией аортокоронарного шунтирования. Образцы крови, взятые в вакутейнеры с ЭДТА, немедленно помещали в холодильник (+4° С), а затем отделяли плазму путем центрифугирования (1500 об/мин, 10 мин.) не позднее 30 минут после взятия. Аликвоты полученной плазмы хранили при -80° С вплоть до анализа.

Группу сравнения составили 27 здоровых лиц, сопоставимых по возрасту с исследуемой группой пациентов – регулярные доноры старшей возрастной группы 55 (42 – 58) лет. Забор образцов крови проводили из кубитальной вены после 10-часового голодания. Процессирование и хранение образцов осуществляли аналогично группе пациентов.

Спектр аминокислот плазмы крови (включая гАрг, но за исключением аминотиолов) определяли методом обращенно-фазного ВЭЖХ-анализа на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) по разработанной нами технологии [26], с использованием ортофталевого альдегида для предколоночной дериватизации и колонки Zorbax Eclipse AAA C18 (150 x 4,6) мм, 3,5 мкм. Концентрации аминокислот рассчитывали, используя

Таблица 1

Распределение общеклинических показателей в соответствии с индексом массы тела пациентов

Показатели	Квартили ИМТ (кг/м ²)				P _{Q1-Q4}
	Q1 ≤25,9	Q2 26,0 – 28,1	Q3 28,2 – 30,1	Q4 ≥30,2	
Возраст, лет	63 (55 – 69)	62 (56 – 67)	64 (59 – 67)	61 (57 – 64)	0,35
Мужчины/женщины, п	14/5	14/4	14/4	15/4	0,87/0,99
ОИМ в анамнезе, п	11	11	8	9	0,67
оГци, мкМ	8,8 (5,8 – 10,7)	8,2 (6,5 – 13,4)	8,2 (6,5 – 10,5)	7,9 (6,8 – 10,6)	0,78
Глюкоза, мМ	5,2 (4,9 – 5,5)	5,2 (4,6 – 5,6)	5,5 (5,2 – 5,7)	5,3 (5,0 – 5,7)	0,33
Общий холестерин, мМ	4,4 (3,2 – 5,2)	4,4 (3,6 – 5,5)	4,0 (3,5 – 4,9)	4,1 (3,8 – 5,0)	0,96
Креатинин, мкМ	85 (78 – 93)	83 (70 – 96)	82 (72 – 105)	91 (82 – 107)	0,40
Мочевина, мМ	5,4 (4,8 – 6,1)	5,2 (4,3 – 6,0)	6,1 (4,8 – 6,7)	5,7 (4,7 – 6,1)	0,87
Общий белок, г/л	73 (70 – 75)	73 (70 – 75)	72 (69 – 73)	73 (69 – 77)	0,88
АлАТ, Ед/л	21 (14 – 34)	19 (17 – 31)	21 (15 – 35)	22 (17 – 33)	0,83
АсАТ, Ед/л	22 (17 – 31)	21 (18 – 26)	20 (18 – 24)	21 (17 – 28)	0,51
Фибриноген, г/л	2,9 (2,6 – 3,2)	3,5 (3,2 – 3,7)	3,2 (3,0 – 3,6)	3,4 (3,0 – 3,8)	0,025

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала.

норвалин в качестве внутреннего стандарта. В описанных условиях времени удерживания аминокислот составляют (мин): Цитруллин – 11,56; гАрг – 14,14; Вал – 18,89; Мет – 19,35; Норвалин – 20,00; Иле – 22,08; Лей – 23,30. В отношении гАрг, предел обнаружения (limit of detection, LOD) составляет 0,10 пмоль, а предел количественного определения (limit of quantification, LOQ) равен 0,20 мкМ для модельных растворов и 0,33 мкМ для плазмы.

Концентрации оГци и общего глутатиона (оГлт) определяли также с помощью ВЭЖХ (Agilent 1100) описанным ранее методом [27].

Данные анализировали с применением программы Statistica 10.0 (Dell, Inc., USA). Степень соответствия распределения данных нормальному закону оценивали с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова - Смирнова. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна – Уитни. Анализ распределения частот проводили с помощью критерия согласия Пирсона и точного критерия Фишера. Статистическую связь между данными анализировали путем вычисления коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Статистически значимыми считали различия данных и корреляции при $p < 0,05$.

Результаты. В изученных нами образцах плазмы крови, взятых у пациентов с ИБС и хронической сердечной недостаточностью 3 функционального класса перед оперативным вмешательством по реваскуляризации миокарда, сохранялся пониженный уровень гАрг и соотношения Мет/оГци. Уровень гАрг у пациентов, составляя 1,4 (1,0-2,0) мкМ, был почти в 2 раза ниже, чем у здоровых доноров ($p = 1 \times 10^{-6}$), у которых его содержание было 2,1 (1,8 – 3,1) мкМ. У половины пациентов уровень гАрг был

ниже 1,4 мкМ - референтной границы понижения его содержания для обозначения высокого риска угрозы инсульта или инфаркта. У доноров-женщин уровень гАрг имел значительно больший межквартильный размах - от 1,8 до 3,1 мкМ, чем у мужчин – от 1,9 – 2,5 мкМ при одинаковом значении медианы- 2,1 мкМ, при этом уровень гАрг у доноров-женщин в нескольких случаях был ниже 1,4 мкМ. У пациентов-женщин наблюдалась тенденция к более низкому уровню Глу+Глн ($p = 0,08$) и оГци ($p = 0,07$), чем у мужчин. Со стороны других биохимических показателей к моменту операции можно отметить редкую встречаемость отклонений. Содержание цитрулина у пациентов и доноров достоверно не различалось, колеблясь, примерно, от 20 до 34 мкМ, не выходя за пределы референтного интервала (табл. 2). Как показало настоящее исследование, разницы в содержании гАрг не наблюдалось между пациентами с ИМТ выше и ниже 25 кг/м². У пациентов с ИМТ больше 25 кг/м² обнаруживался более высокий уровень глюкозы ($p=0,04$). В зависимости от ИМТ ни уровни Мет, ни оГци или каких-либо других аминокислот и азотистых веществ не имели различий.

Наличие избыточного веса у пациентов не было связано с уровнями Мет, оГци и гАрг. Как показало дальнейшее изучение корреляций уровней аминокислот, с одной стороны, и гАрг, с другой, только уровни Мет ($R = 0,23, p = 0,076$) и оГци ($R = -0,30, p=0,021$) являлись статистически значимыми (рисунок, а, б). Помимо аминокислот, и другие клинико-биохимические показатели не имели значимых корреляционных связей с гАрг, включая ИМТ, уровни глюкозы или креатинина (рис., ж). Оценка связей этих показателей между собой показала, что ИМТ коррелирует положительно с уровнем глюкозы ($R = 0,36, p = 0,011$), но не креатинина. Наиболее сильная положительная корреляционная связь была обнаружена между гАрг и соотношением Мет/оГци ($R = 0,39, p = 0,0025$, рис., в), а также Глн+Глу ($R = 0,31, p = 0,0064$, рис., и). Соотношение Мет/оГци, имея достоверную корреляционную положительную связь с уровнем гАрг, не коррелирует с уровнем глюкозы или ИМТ. Корреляционная связь положительная для Мет (см.рисунок,а,б) и отрицательная для оГци (рис., б) с уровнями гАрг была значительно слабее. Дальнейшее исследование связи этого соотношения и других изучаемых показателей отражено в табл. 3, которая группирует значения всех показателей в соответствии с поквартильными распределениями уровней гАрг.

При сравнении значений изученных показателей в подгруппах, соответствующих поквартильным значениям уровней гАрг, можно видеть тренд соответствия низких значений соотношения Мет/оГци низким значениям гАрг (табл. 3). Можно отметить более низкую частоту встречаемости в прошлом инфарктов миокарда в подгруппе с уровнем гАрг выше 2,1 мкМ (см.табл. 3). Существенных межквартильных различий остальных показателей не выявлено, включая показатель ИМТ. Со-

Уровни аминокислот (мкМ) у пациентов с ИБС

АК, мкМ	Все пациенты (n=74)	Подгруппы пациентов				Референтные интервалы [13]
		Мужчины (n=57)	Женщины (n=17)	ИМТ≤25 кг/м ² (n=12)	ИМТ>25 кг/м ² (n=62)	
гАрг	1,4 (1,0 – 2,0)	1,5 (1,1 – 2,0)	1,3 (0,8 – 2,0)	1,4 (1,2 – 2,1)	1,5 (1,1 – 1,9)	> 1,4
Цитрул-лин	25 (21 – 30)	25 (21 – 30)	26 (21 – 28)	26 (20 – 34)	25 (21 – 29)	12 - 55
Мет	23 (18 – 28)	24 (19 – 28)	20 (17 – 24)	21 (18 – 26)	23 (17 – 28)	6 - 40
оГци	8,1 (6,4 – 10,5)	8,5 (6,8 – 11,9)	7,7 (5,5 – 8,8)	8,2 (5,4 – 10,5)	8,1 (6,5 – 10,4)	< 12
оГлт	3,5 (2,6 – 4,7)	3,5 (2,8 – 4,5)	3,5 (2,2 – 4,7)	3,1 (2,5 – 4,2)	3,6 (2,7 – 4,7)	2 – 8
Асп и Асн	39 (32 – 49)	40 (35 – 50)	34 (28 – 39)	37 (34 – 46)	39 (32 – 50)	30 - 100
Глу и Глн	500 (430 – 583)	502 (36 – 588)	471 (359 – 538)	456 (423 – 567)	502 (433 – 579)	400 - 1000
Вал	219 (180 – 254)	220 (182 – 253)	205 (176 – 247)	223 (192 – 232)	212 (178 – 265)	141 - 317
Иле	55 (47 – 58)	55 (48 – 68)	52 (40 – 69)	51 (48 – 62)	55 (46 – 69)	37 - 98
Лей	122 (106 – 147)	125 (110 – 149)	119 (92 – 141)	118 (97 – 149)	123 (108 – 145)	75 - 175

Примечание. Данные представлены в виде медианы и межквартильного интервала; достоверных различий между подгруппами не выявлено (тест Манна-Уитни); АК – аминокислоты.

отношение Мет/оГци, отчасти за счет разницы в содержании оГци, между крайними квартилями достоверно различалось ($p = 0,033$). У пациентов с самыми высокими уровнями гАрг (Q4) оно было почти в 2 раза выше.

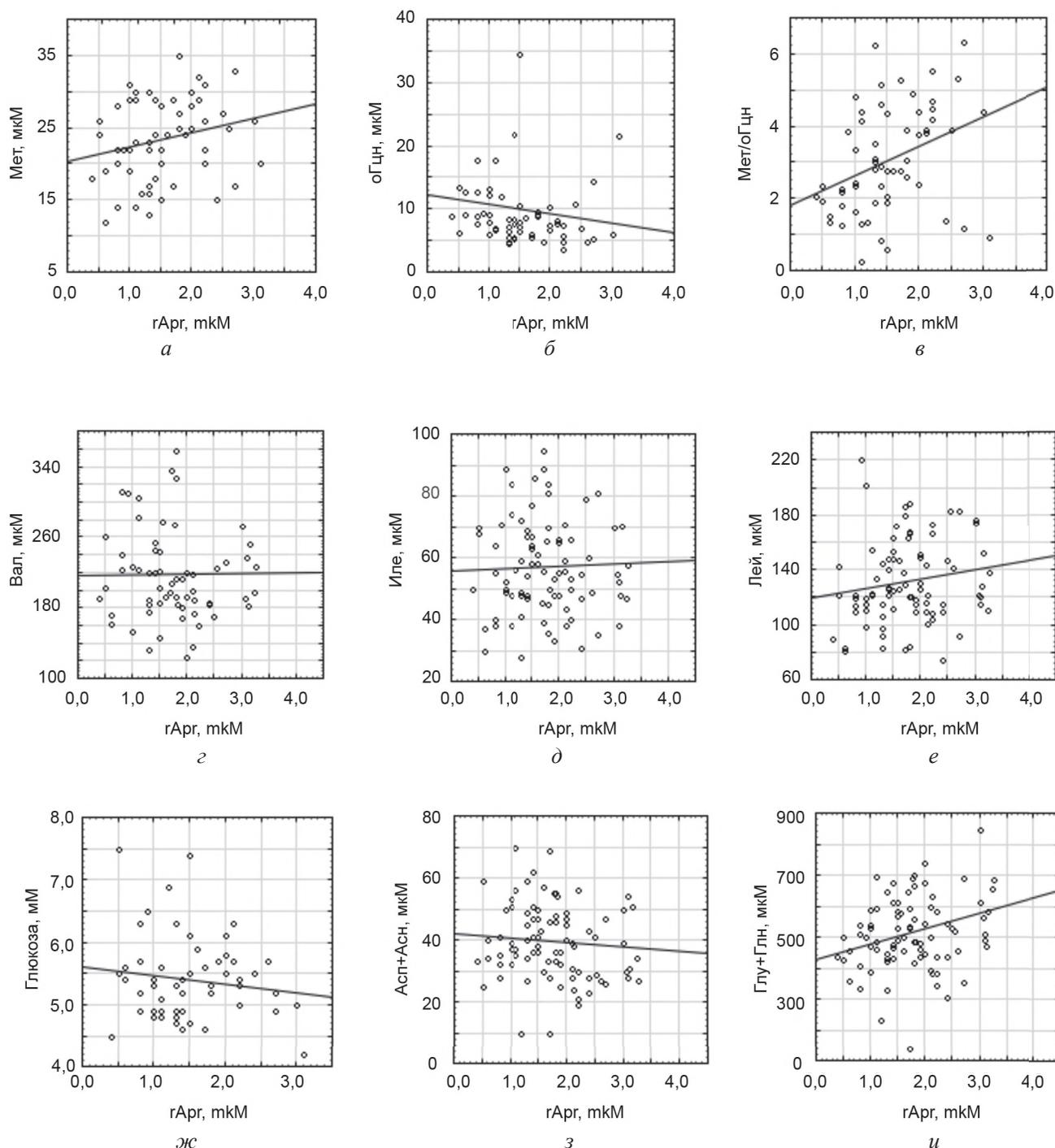
Обсуждение. У пациентов с многососудистым поражением коронарного русла имела артериальная гипертензия и хроническая сердечная недостаточность III функционального класса (фракция выброса левого желудочка не менее 50% от должного уровня). Кроме того, у большинства пациентов к моменту операции была избыточная масса тела, составившая в среднем $28,4 \pm 3,6$ кг/м². ИМТ у них положительно коррелировал с уровнем глюкозы, но не гАрг или соотношением Мет/оГци. Нарушение обмена липидов привело у обследованных пациентов к существенному нарушению кровотока в сердечной мышце. К моменту операции при рассмотрении поквартильного распределения лабораторно-диагностических показателей в зависимости от ИМТ, различий между ними, как правило, не наблюдалось (см. табл. 1). У четверти пациентов ($n=18$) ИМТ был ниже $25,3$ кг/м², а пониженный уровень гАрг < $1,4$ мкМ встречался у 8 из них. Остальные 56 пациентов с повышенным ИМТ в 47% имели пониженный уровень гАрг. Таким образом, пониженный уровень гАрг часто встречался у пациентов с пониженным и повышенным ИМТ. Как показало настоящее исследование, уровень гАрг ниже $1,4$ мкМ наблюдался, примерно, у половины обследованных и не зависел от ИМТ и уровня глюкозы. По данным современной литературы, эта часть пациентов может быть отнесена к группе более высокого риска возникновения острых ишемических осложнений [2, 6, 28].

Некодируемая минорная аминокислота гАрг известна в качестве предиктивного маркера острых ишемических событий у пациентов с нарушениями кровообращения,

обладая некоторыми преимуществами, перед другими, в том числе, уретическими пептидами [1]. Низкие уровни гАрг тесно связаны с повышенной смертностью: относительные риски сердечно-сосудистых заболеваний и смерти от всех причин более чем удвоились (+ 120%) на единицу снижения величины гАрг (мкМ) [3]. Этими авторами выявлено, что у пациентов с уровнем гАрг меньше $0,87$ мкМ смертность в 2 раза выше, чем у пациентов с уровнем гАрг выше $1,4$ мкМ, для которых обнаружено статистически значимое увеличение смертности на 25% по сравнению с популяционной когортой.

В нашей работе показано, что у близких по возрасту доноров мужчин и женщин гАрг варьируется в пределах $2,3$ ($1,8-3,1$) [5], что несколько выше, чем в общей популяции из европейского исследования $1,9$ ($1,7-2,4$) мкМ [4, 5], и значительно выше, чем в обследованной группе пациентов с ИБС $1,4$ ($1,0-2,0$) мкМ. Кроме того, в предыдущем нашем исследовании [7], показано, что значительное высвобождение аминокислот предшествует активации фибринолиза, и в частности, Арг и Лиз, наблюдающееся при активации фибринолиза, может возникать повышение уровней гАрг. На эту связь также указывают работы по изучению транспорта катионных аминокислот через клеточные мембраны [29]. Это следует учитывать при значительной активации внутрисосудистого свертывания и фибринолиза.

В работах последних лет с появлением современных методов анализа спектра аминокислот плазмы обнаружены новые связи между нарушениями липидного обмена и балансом аминокислот. В этих работах установлены некоторые устойчивые закономерности, прежде всего, в сдвигах аминокислот, которые после трансаминирования сразу становятся кетокислотами-участниками



Диаграммы рассеяния, отражающие связь уровня гАрг с другими показателями: Мет (а), оГци (б), соотношением Мет/оГци (в), Вал (г), Иле (д), Лей (е), глюкозой (ж), Асп+Асн (з), Глу+Глн (и).

цикла Кребса, как, например, Глу [30], и разветвленными кетокислотами, которые способны, превращаясь в пропионил-СоА, и далее через метилмалонил-СоА-мутазную реакцию пополнять цикл Кребса [31, 32]. Продукты дезаминирования этих аминокислот могут в клетках быть источниками начальных субстратов для биосинтеза глюкозы или заменять её в окислительном метаболизме, пополняя пул кислот цикла Кребса. Другие аминокислоты после декарбоксилирования способ-

ны окисляться подобно жирным кислотам по пути утилизации ацетил-СоА.

Настоящее исследование показало, что из всего спектра аминокислот и производных показателей только соотношение Мет/оГци и сами эти аминокислоты характеризуются корреляционной связью с уровнями гАрг. Так же как и в отношении гАрг, у этих аминокислот не обнаружена корреляционная связь с ИМТ. Только у 12 пациентов из 74 был ИМТ ниже 25, но значимого от-

Распределение показателей в соответствии с уровнем гАрг в плазме пациентов

Показатели	Квартили гАрг				P _{Q1-Q4}
	Q1 ≤1,0мкМ	Q2 1,1–1,4 мкМ	Q3 1,5-2,0 мкМ	Q4 ≥2,1 мкМ	
Возраст, лет	62 (60 – 67)	64 (59 – 65)	58 (57 – 65)	60 (54 – 62)	0,20
ИМТ, кг/м ²	29,6 (25,1 – 32,5)	29,2 (25,6 – 30,8)	28,7 (26,0 – 30,1)	27,0 (25,3 – 29,1)	0,50
Мет, мкМ	22 (19 – 28)	23 (17 – 27)	25 (20 – 28)	26 (20 – 29)	0,27
oГци, мкМ	9,2 (7,8 – 12,8)	7,2 (5,6 – 10,2)	7,9 (6,4 – 9,6)	6,9 (5,2 – 8,2)	0,022
oГлт, мкМ	3,0 (2,3 – 4,4)	4,1 (3,0 – 4,7)	3,2 (2,7 – 4,4)	3,0 (1,3 – 5,4)	0,98
Мет/oГци	2,2 (1,7 – 2,4)	3,0 (1,6 – 4,3)	2,8 (2,4 – 4,4)	4,2 (3,8 – 4,7)	0,033
Цитруллин, мкМ	25 (21 – 29)	27 (21 – 29)	30 (22 – 36)	25 (20 – 29)	0,79
Вал, мкМ	223 (172 – 261)	220 (183 – 254)	212 (192 – 221)	170 (160 – 200)	0,145
Иле, мкМ	52 (40 – 68)	52 (48 – 68)	64 (55 – 70)	53 (40 – 70)	0,82
Лей, мкМ	115 (99 – 121)	125 (111 – 143)	148 (115 – 163)	116 (108 – 167)	0,62
Глюкоза, мМ	5,4 (4,9 – 5,7)	4,9 (4,8 – 5,4)	5,6 (5,3 – 5,9)	5,4 (5,0 – 5,6)	0,72
Асп+Асн, мкМ	37 (32 – 50)	43 (36 – 54)	46 (38 – 50)	31 (27 – 47)	0,36
Глу+Глн, мкМ	473 (409 – 531)	464 (428 – 603)	543 (463 – 593)	456 (384 – 528)	0,89
Холестерин, мМ	3,9 (2,9 – 5,1)	4,4 (3,8 – 5,3)	4,1 (3,7 – 4,8)	4,7 (3,4 – 6,8)	0,20
Общий белок, г/л	71 (68 – 74)	73 (70 – 79)	73 (71 – 74)	74 (71 – 75)	0,15
Фибриноген, г/л	3,2 (2,9 – 3,3)	3,1 (2,9 – 3,6)	3,2 (2,8 – 3,5)	3,2 (2,5 – 4,2)	0,57
АлАТ, Ед/л	18 (14 – 33)	22 (16 – 31)	25 (17 – 35)	21 (18 – 38)	0,46
АсАТ, Ед/л	17 (15 – 23)	21 (19 – 26)	22 (21 – 30)	21 (18 – 35)	0,075
Мочевина, мМ	5,8 (4,6 – 6,1)	5,5 (5,0 – 6,5)	5,5 (4,3 – 6,5)	5,0 (4,8 – 6,1)	0,61
Креатинин, мкМ	84 (71 – 92)	84 (76 – 102)	96 (78 – 107)	83 (74 – 89)	0,98
ОИМ в анамнезе, %	58	56	64	53	0,37

личия в содержании Мет у них по сравнению с остальными пациентами не обнаружено. Из данных других исследований известно, что повышение ИМТ и oГци часто встречается одновременно у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, но корреляция между этими показателями может отсутствовать, так как нарушение реакций метилирования (гипометилирование) и ресинтеза Мет из Гци (реметилирование) не имеет прямых связей с регуляцией обмена липидов [33]. При диабете второго типа уровни Мет могут не возрастать, хотя часто можно наблюдать увеличенный уровень oГци, ассоциированный с нарушением функции нефрона [34]. Из данных литературы известно, что уровни аминокислот Глу и Глн повышены у пациентов с ожирением [14, 30]. В нашем исследовании обнаружена положительная корреляционная связь между содержанием Глу и Глн с гАрг (рис., и).

Гци является продуктом использования Мет в реак-

циях трансметилирования, протекающих особенно интенсивно при росте и обновлении клеток, при активации регуляторных процессов и обновлении клеточных белков [20, 35].

Содержание oГци в крови является результатом соотношения скоростей реакций утилизации Мет, включая путь транссульфирования в тканях и реметилирования Гци в виде S-аденозил-Гци [15]. Наиболее интенсивно реакции с участием Мет и Гци в норме протекают в тканях печени и почек [36]. Таким образом, уровень Мет очень сильно связан с метаболизмом Гци. Поэтому в случае отсутствия данных о содержании oГци, что часто встречается в литературе, затруднительна интерпретация сдвигов уровня Мет в плазме крови и более точное определение роли Мет в патогенезе и диагностике сердечно-сосудистых заболеваний. Повышенный уровень oГци соответствует высокому содержанию S-аденозил-Гци в клетках. Последний является ингибитором процессов трансметилирования, что при-

водит в свою очередь к феномену гипометилирования [11, 12]. При рассмотрении данных литературы обращает на себя внимание очень редкие случаи отклонений в содержании Мет от общепринятого референтного интервала 6 - 40 мкМ. В подавляющем числе исследований сдвиги в содержании Мет изучают путем анализа размахов колебаний в когортах с высокими и низкими значениями этой аминокислоты и относительно групп сравнения. В частности, в работах последних лет получены данные о значительных изменениях уровней Мет при сердечно-сосудистых заболеваниях [25, 37]. В частности, показано, что сдвиг уровня Мет в сторону понижения ассоциируется с увеличением риска острого инфаркта миокарда у пациентов с высоким уровнем циркулирующих ЛПНП и других атерогенных липидов [25]. Интерпретация данных существенно улучшается, если одновременно с уровнем Мет имеется возможность оценить уровень оГци, так как высокий уровень этого аминотиола указывает на возможность гипометилирования и недостаточной скорости реметилирования Гци и поступления Мет в общий кровоток не за счет пищевых источников, а за счет реакций с участием витаминов В12 и фолиевой кислоты. Известно, что при гипергомоцистеинемии в тканях наблюдается высокое содержание S-аденозилгомоцистеина, являющегося сильным ингибитором метилтрансфераз, в результате чего для метилирования различных субстратов, включая нуклеиновые кислоты и белки, требуются более высокие уровни Мет в крови и S-аденозилметионина в клетках. Как показало настоящее исследование, у пациентов с уровнем гАрг менее 1,40 мкМ соотношение Мет/оГци было в среднем ниже 2. У пациентов с уровнем гАрг выше 1,4 мкМ соотношение Мет/оГци превышало значение 2,5, а при уровне гАрг выше 2,2 мкМ оно превышало значение 3,8 (табл. 3). При низком уровне гАрг снижение соотношения Мет/оГци до среднего уровня 1,7 более чем у 62% пациентов наблюдалось при невысоких (до 12 мкМ) значениях оГци, за счет понижения содержания Мет. Таким образом, у пациентов одновременно со снижением активности АГАТ-реакции, в которой образуется гАрг и предшественник креатина гуанидинуксусная кислота, наблюдается снижение превалирования уровня Мет над Гци. Это, согласно современным представлениям [11, 12], может приводить к феномену гипометилирования. В современных исследованиях отмечается, что понижение уровня Мет в плазме может быть связано с повышенным риском развития ОИМ среди групп пациентов с высоким уровнем циркулирующего ЛПНП-холестерина или апо В [25]. Значительное понижение уровня Мет отмечали также и у пациентов, перенесших ишемический инсульт [38].

Уровни гАрг ниже 1,4 мкМ у пациентов с острым коронарным синдромом, наблюдавшемся в возрасте от 18 до 85 лет, обладают чувствительностью для определения рисков инфаркта или инсульта на уровне 25% [2]. В настоящем исследовании показано, что понижение соотношения Мет/оГци ниже 1,7 указывает на дополнительное расширение нарушений метаболизма у этих пациентов. Можно считать, что среди характерных метаболических сдвигов, определяющих наиболее важные отклонения, имеются следующие: 1) нарушение обмена липидов, 2) угнетение ключевой реакции образования креатина (АГАТ-реакции), 3) нарушение реакций трансметилирования с участием Мет и реметилирования Гци, а также связанных с этими реакциями сигнальных путей. Для развивающейся современной лабораторной диагностики с применением метаболического анализа указанные метаболические пути и отдельные метаболиты могут быть рекомендованы при учете

главных целей аналитического метода.

Выводы. У пациентов с ИБС и недостаточностью кровообращения в результате значительных сдвигов метаболизма липидов наблюдались выраженные отклонения в гомеостазе аминокислот-участников процессов метилирования. Примерно у половины пациентов непосредственно перед операцией по реваскуляризации миокарда обнаружен пониженный уровень гАрг, которому соответствовало снижение уровня Мет/оГци. Показатель Мет/оГци, отражая в основном баланс метилирования (трансметилирования) и реметилирования, в меньшей степени подвержен колебаниям, чем содержание Мет или оГци и характеризуется более тесной связью с уровнем гАрг. Соотношение Мет/оГци, тесно коррелируя с уровнем гАрг, обнаруживает связь активации АГАТ-реакции, и реакций трансметилирования и реметилирования Гци, выделяя когорту пациентов с наиболее глубокими и опасными изменениями тканевого метаболизма. Соотношение Мет/оГци, уровни гАрг и Глн у пациентов с ИБС не были связаны с варьированием ИМТ и содержанием глюкозы, что указывает на их дополнительное диагностическое и, возможно, прогностическое значение. Целесообразны дальнейшие исследования диагностического и прогностического значения гАрг и соотношения Мет/оГци у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Благодарности. Авторы выражают благодарность менеджменту ПСПбГМУ им. И.П. Павлова за поддержку в организации исследования.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках выполнения государственного задания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-4, 6,7,10-15, 17-20,22-25, 27-30,32-38 см. REFERENCES)

1. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Молчан Н.С. Значение определения уровня гомоаргинина у пациентов с ишемической болезнью сердца при операциях реваскуляризации миокарда. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(5): 281-6.
2. Титов В. Н., Рожкова Т.А., Каминная В.И., Алчинова И.Б. Атеросклероз и атероматоз - два последовательных нарушения метаболизма, патология биологических функций трофологии и функции эндоэкологии. Основы профилактики ишемической болезни сердца. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(4): 196-204.
3. Ариповский А. В., Титов В.Н. Биологически активные пептиды в регуляции метаболизма. Пептоны, аминокислоты, жирные кислоты, липопротеины, липиды и действие нутрицевтиков. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019; 64(1): 14-23.
4. Субботина Т.Ф., Жлоба А.А., Алексеевская Е.С., Бируля И.В. Интерпретация аминокислотного профиля плазмы крови с использованием полимаркерного подхода. *Ученые Записки СПбГМУ*. 2015; 22(4): 76-80.
5. Жлоба А.А. Лабораторная диагностика при гипергомоцистеинемии. *Клинико-лабораторный консилум*. 2009; 26(1): 49-60.
6. Жлоба А.А., Субботина Т.Ф., Шипаева К.А. Способ определения содержания гомоаргинина в плазме крови и других биологических жидкостях человека. Патент РФ. № 2609873; 2017.
7. Жлоба А.А., Маевская Е.Г. Дисфункция анаплеротического пути энергетического метаболизма от аминокислот к сукцилату у лиц старшей возрастной группы. *Артериальная Гипертензия*. 2011; 17(1): 74-8.

REFERENCES

1. Raedle-Hurst T., Mueller M., Meinitzer A., März W., Dschietzig T. Homocysteine - A prognostic indicator in adolescents and adults with complex congenital heart disease? Fukumoto Y., ed. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184333.

2. Atzler D., Baum C., Ojeda F., Keller T., Cordts K., Schnabel R.B. et al. Low homoarginine levels in the prognosis of patients with acute chest pain. *J. Am. Heart Assoc.* 2016; 5(4): e002565.
3. März W., Meinitzer A., Drechsler C., Pilz S., Krane V., Wanner C. Homoarginine as a biomarker for the risk of mortality. Patent US 9,506,909 B2; 2016.
4. Atzler D., Appelbaum S., Cordts K., Ojeda F.M., Wild P.S., Münzel T., et al. Reference intervals of plasma homoarginine from the German Gutenberg Health Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2016; 54(7): 1231-7.
5. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Molchan N.S. The value of detection of homoarginine level in patients with ischemic heart disease under operations of myocardium re-vascularization. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2018; 63(5): 281-6. (in Russian)
6. Niekamp C., Atzler D., Ojeda F.M., Sinning C.R., Lackner K.J., Böger R.H., et al. Cross-sectional associations between homoarginine, intermediate phenotypes, and atrial fibrillation in the community—The Gutenberg Health Study. *Biomolecules.* 2018; 8(3) pii: E86.
7. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Lupan D.S., Bogova V.A., Kusheleva O.A. Arginine and lysine as products of basic carboxypeptidase activity associated with fibrinolysis. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry.* 2012; 6(3): 261-5.
8. Titov V. N., Rozhkova T.A., Kaminnaya V.I., Alchinova I.B. Atherosclerosis and atheromatosis are consecutive metabolic disorders. Pathology of the biological functions of trophology and endoecology is the basis for ischemic heart disease prevention. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2018; 63(4): 196-204. (in Russian)
9. Aripovsky A.V., Titov V.N. Biologically active peptides in metabolism regulation. Peptons, peptides, amino acids, fatty acids, lipoproteins, lipids, and the effect of nutraceuticals. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2019; 64 (1): 14-23. (in Russian)
10. Maltais-Payette I., Boulet M.M., Prehn C., Adamski J., Tchernof A. Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations. *Nutr. Metab. (Lond).* 2018; 15: 78.
11. Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(38): 29318-23.
12. Xiao Y., Su X., Huang W., Zhang J., Peng C., Huang H. et al. Role of S-adenosylhomocysteine in cardiovascular disease and its potential epigenetic mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2015; 67: 158-66.
13. Laposata's Laboratory Medicine: Diagnosis of Disease in the Clinical Laboratory. 3rd ed. Laposata M., ed.; 2019. Available at: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2503§ionid=201361245> (Accessed 7 May 2019).
14. Geidenstam N., Magnusson M., Danielsson A.P.H., Gerszten R.E., Wang T.J., Reinius L.E. et al. Amino acid signatures to evaluate the beneficial effects of weight loss. *Int. J. Endocrinol.* 2017; 6490473.
15. Dhar I., Svingen G.F.T., Ueland P.M., Lysne V., Svenningsson M.M., Tell G.S., Plasma cystathionine and risk of incident stroke in patients with suspected stable angina pectoris. *J. Am. Heart Assoc.* 2018; 7(17): e008824.
16. Subbotina T.F., Zhloba A.A., Alekseevskaya E.S., Birulya I.V. Interpretation of plasma amino acid profile using multiple marker approach. *Uchenye Zapiski SPbGMU.* 2015; 22(4): 76-80. (in Russian)
17. Fukagawa N.K., Martin J.M., Wurthmann A., Prue A.H., Ebenstein D., O'Rourke B. Sex-related differences in methionine metabolism and plasma homocysteine concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72(1): 22-9.
18. Midttun Ø., Theofylaktopoulou D., McCann A., Fanidi A., Muller D.C., Meyer K. Circulating concentrations of biomarkers and metabolites related to vitamin status, one-carbon and the kynurenine pathways in US, Nordic, Asian, and Australian populations. *Am. J. Clin. Nutr.* 2017; 105(6): 1314-26.
19. Lepage N., McDonald N., Dallaire L., Lambert M. Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin. Chem.* 1997; 43(12): 2397-402.
20. Zhang N. Role of methionine on epigenetic modification of DNA methylation and gene expression in animals. *Anim. Nutr.* 2018, 4(1): 11-6.
21. Zhloba A.A. Laboratory diagnosis in hyperhomocysteinemia. *Kliniko-laboratornyi Konsilium.* 2009; 26(1): 49-60. (in Russian)
22. Garlick P.J. Toxicity of methionine in humans. *J. Nutr.* 2006; 136(6 Suppl):1722S-1725S.
23. Shapira N. Commentary: differential effects of high-protein diets derived from soy and casein on blood-brain barrier integrity in wild-type mice. *Front Nutr.* 2018; 5: 67.
24. Dhar I., Svingen G.F.T., Pedersen E.R., DeRatt B., Ulvik A., Strand E. Et al. Plasma cystathionine and risk of acute myocardial infarction among patients with coronary heart disease: results from two independent cohorts. *Int. J. Cardiol.* 2018; 266: 24-30.
25. Dhar I., Lysne V., Seifert R., Svingen G.F.T., Ueland P.M., Nygård O.K. Plasma methionine and risk of acute myocardial infarction: Effect modification by established risk factors. *Atherosclerosis.* 2018; 272: 175-181.
26. Zhloba A.A., Subbotina T.F., Shipaeva K.A. The way for determining the content of homoarginine in blood plasma and other biological fluids of human. Patent RF N 2609873; 2017. (in Russian)
27. Zhloba A.A., Subbotina T.F. Homocysteinylolation score of high-molecular weight plasma proteins. *Amino Acids.* 2014; 46(4): 893-9.
28. Meinitzer A., Puchinger M., Winklhofer-Roob B.M., Rock E., Ribalta J., Roob J.M. et al. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin. Chim. Acta; Int. J. Clin. Chem.* 2007; 384(1-2): 141-8.
29. Chafai A., Fromm M.F., König J., Maas R. The prognostic biomarker L-homoarginine is a substrate of the cationic amino acid transporters CAT1, CAT2A and CAT2B. *Sci. Rep.* 2017; 7: 4767.
30. Maltais-Payette I., Boulet M.M., Prehn C., Adamski J., Tchernof A. Circulating glutamate concentration as a biomarker of visceral obesity and associated metabolic alterations. *Nutr. Metab. (Lond.);* 2018; 15: 78.
31. Zhloba A.A., Maevskaya E.G. The dysfunction of anaplerotic pathway of energy metabolism from amino acids to succinate in the elderly. *Arterial'naya Gipertenziya.* 2011; 17(1): 74-8. (in Russian)
32. Geidenstam N., Al-Majdoub M., Ekman M., Spégel P., Ridderstråle M. Metabolite profiling of obese individuals before and after a one year weight loss program International. *J. Obes.* 2017; 41: 1369-78.
33. Libert D.M., Nowacki A.S., Natowicz M.R., Metabolomic analysis of obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: amino acid and acylcarnitine levels change along a spectrum of metabolic wellness. *Peer J.* 2018; 6: e5410.
34. Tessari P., Coracina A., Kiwanuka E., Vedovato M., Vettore M., Valerio A. et al. Effects of insulin on methionine and homocysteine kinetics in type 2 diabetes with nephropathy. *Diabetes.* 2005; 54(10): 2968-76.
35. Gao J., Cahill C.M., Huang X., Roffman J.L., Lamon-Fava S., Fava M. et al. S-adenosyl methionine and transmethylation pathways in neuropsychiatric diseases throughout life. *Neurotherapeutics.* 2018; 15(1):156-75.
36. Pacana T., Cazanave S., Verdianelli A., Patel V., Min H.-K., Mirshahi F. et al. Dysregulated hepatic methionine metabolism drives homocysteine elevation in diet-induced nonalcoholic fatty liver disease *PLoS One.* 2015; 10(8): e0136822.
37. Joseph J., Loscalzo J. Methoxistasis: Integrating the roles of homocysteine and folic acid in cardiovascular pathobiology. *Nutrients.* 2013; 5(8): 3235-56.
38. Goulart V.A.M., Sena M.M., Mendes T.O., Menezes H.T., Cardeal Z.L., Paiva M.J.N. et al. Amino acid biosignature in plasma among ischemic stroke subtypes. *BioMed Res. Int.* 2019; Article ID 8480468. <https://doi.org/10.1155/2019/8480468>.