

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М. І. ПИРОГОВА
МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ІВАНОЧКО РУСЛАНА БОГДАНІВНА

УДК: 616.61-008.64-036.12-085.386-092

ДИСЕРТАЦІЯ
СТАН СИСТЕМИ L-АРГІНІН/NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА
ТА ОСОБЛИВОСТІ ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ
У ХВОРИХ З ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ
ЗА УМОВ ГЕМОДІАЛІЗУ

14.01.32 – медична біохімія

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Іваночко Р. Б.

Науковий керівник – **Склярів Олександр Якович**, доктор медичних наук,
професор

Вінниця – 2018

АНОТАЦІЯ

Іваночко Р. Б. Стан системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та особливості оксидативних процесів у хворих з хронічною нирковою недостатністю за умов гемодіалізу. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.01.32 “Медична біохімія” (22 - охорона здоров’я). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2018; Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, Вінниця, 2018.

Хронічна ниркова недостатність характеризується ендотеліальною дисфункцією, гіпертензією, зростанням рівня циркулюючих цитокінів, зміною функцій тромбоцитів, що асоційовано з порушенням системи L-аргінін-нітрогену оксид [168, 245]. Активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у поєднанні з порушенням метаболізму нітрогену оксиду (NO) є одним із механізмів пошкодження функціонування нирок за умов хронічної ниркової недостатності (ХНН) [200].

Метою роботи було з’ясувати функціональний стан системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та особливості оксидативних процесів у хворих з ХНН різної етіології за умов гемодіалізу.

Обстеження проводились на базі нефрологічного відділення Львівської обласної клінічної лікарні та на базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща). Всього було обстежено 99 хворих, з них пацієнтів з ХНН на ґрунті гломерулонефриту – 42, з цукровим діабетом 2-го типу – 20. На базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща) було обстежено 37 хворих. Групу порівняння склали кров 20 донорів, середнім віком – 48 років.

Обстеження хворих проведено на загальних етичних принципах, ухвалених Інтернаціональним конгресом з біоетики (Київ, 2000) та комісії з біоетики ЛНМУ імені Данила Галицького, протокол № 1 від 20 січня 2014 р.

Проведеними дослідження визначені зміни компонентів NO-синтазної системи, показників процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту, обґрунтовані пропозиції до комплексної терапії хворих з ХНН до та після гемодіалізу.

Уперше у хворих з ХНН різної етіології охарактеризовані особливості стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у комплексі з оцінкою рівнів її вазоактивних модуляторів (гідроген сульфїду, катехоламінів, АДМА та СДМА) у плазмі крові та лізаті лімфоцитів. Засвідчено, що у хворих на ХНН виявляється дисфункція системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа, про що свідчить зниження рівня L-аргїніну (на 33%, $p<0,01$), H_2S - на 23% ($p<0,05$), зростання рівня метаболїчних інгїбіторів NO-синтази - АДМА - у 2,3 рази ($p<0,01$) та СДМА - у 3,4 рази ($p<0,01$), концентрації норадреналїну у 2,3 рази ($p<0,001$), суми $NO_2^-+NO_3^-$ (у 2,2 рази) у плазмі крові, порівняно з показниками групи донорів. Відзначено зростання рівня процесів ліпопероксидації у плазмі крові та лізаті лімфоцитів - вміст ТБК-активних продуктів підвищився на 34% ($p<0,05$), що супроводжувалось зменшенням концентрації вітаміну С, як загальної його форми (на 41%, $p<0,05$), так і окисненої (на 22%, $p<0,05$).

У лізаті лімфоцитів до гемодіалізу, порівняно з показниками групи донорів, концентрація L-аргїніну була нижчою на 31% ($p<0,05$), рівень активності iNOS зростав (у 15 разів, $p<0,01$), тоді як рівень активності eNOS знижувався (на 70%, $p<0,05$); активність аргїнази мала тенденцію до зменшення (на 14%); підвищувався вміст ТБК-активних продуктів (на 23%, $p<0,05$); знижувався рівень активності СОД та каталази (на 19% та 44%, $p<0,05$, відповідно). У хворих з ХНН на тлі цукрового діабету 2-го типу рівень активності iNOS у лізаті лімфоцитів до гемодіалізу був значно меншим (в 6,5 рази, $p<0,01$), а активність eNOS вища (на 20%) порівняно з показниками хворих на ХНН без ЦД.

Доведено, що сеанс гемодіалізу у хворих на ХНН спричиняв у плазмі крові зниження вмісту L-аргїніну на 20%, H_2S - на 12% ($p<0,05$), концентрації

АДМА та СДМА (на 49%, $p < 0,05$ та 48%, $p < 0,05$, відповідно), вмісту норадреналіну на 24% ($p < 0,001$), у порівнянні з показниками до ГД.

У лізаті лімфоцитів після проведення сеансу гемодіалізу концентрація L-аргініну знизилась на 30% ($p < 0,05$), нітрит-аніону на 21% ($p < 0,05$), активність iNOS (у 14 разів, $p < 0,01$) та активність eNOS (у 8 разів, $p < 0,01$), що свідчить про вплив процедури ГД на стан системи L-аргінін / NO-синтаза/ NO у лімфоцитах. У хворих з ХНН на тлі цукрового діабету 2-го типу після гемодіалізу активність iNOS знижувалась менш значуще (у 3,3 рази, $p < 0,01$), ніж у хворих на ХНН на тлі гломерулонефриту.

Доведено, що у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН після гемодіалізу, у порівнянні з показниками до гемодіалізу, зменшувався вміст ТБК-активних продуктів (на 22%, $p < 0,05$); вміст H_2S - на 23%. Активність СОД та каталази були нижчими на 25% ($p < 0,05$) та 65% ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольної групи.

Оцінені зміни нітрато-оксидативних процесів після гемодіалізу у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу, які свідчать, що рівень активності iNOS зменшувався у 3,6 рази ($p < 0,01$), активність eNOS знижувалась у два рази; зміни концентрації L-аргініну, нітрит-аніона та сума $NO_2^- + NO_3^-$ не мали суттєвої різниці у порівнянні з відповідними показниками хворих з ХНН без ЦД. Концентрація H_2S знижувалась у меншій степені – на 11%, тоді як у хворих на ХНН на 23%, вміст ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів повертався до вихідних значень, порівняно з показниками до гемодіалізу. Порівнюючи зміни активності СОД та каталази у хворих з ХНН з та без ЦД у лізаті лімфоцитів відзначено, що за умов гіперглікемії активність каталази знижувалась більш виражено.

Практичне значення роботи пов'язано з поглибленням уявлення щодо впливу сеансу гемодіалізу на компоненти системи L-аргінін/ NO-синтаза/аргіназа, вміст гідроген сульфід, катехоламінів та вітаміну С у хворих з ХНН різної етіології.

Отримані результати є підґрунтям для корекції лікування хворих на ХНН з ендотеліальною дисфункцією враховуючи зменшення вмісту L-аргініну, гідроген сульфїду, вітаміну С і зростання рівнів норадреналїну, АДМА та СДМА у плазмі крові.

Визначені зміни активності NO-синтази, аргїнази та рівня L-аргініну у лізаті лімфоцитів лягли нового способу діагностики важкості стану хворих з ХНН «Спосіб прогнозування стану хворих з діабетичною нефропатією за умов гемодіалїзу» (патент України на корисну модель № 110109).

Результати дисертації впроваджені у навчальний процес кафедр біохїмії Тернопільського державного медичного університету імені Я.І. Горбачевського, ВДНЗ “Українська медична стоматологічна академія”, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

Ключові слова: хронїчна хвороба нирок, гемодіалїз, NO-синтаза, L-аргінін, аргїназа, пероксидне окиснення ліпїдів, вітамін С, катехоламіни.

ANNOTATION

Ivanochko R. B. The status of L-arginine / NO-synthase / arginase system and peculiarities of oxidative processes in patients with chronic renal failure under conditions of hemodialysis. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for a degree of the candidate of medical sciences, specialty 14.01.32 “Medical Biochemistry”. – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health Care of Ukraine, Lviv, 2018; National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, 2018.

Chronic renal failure is characterised by the endothelial dysfunction, increase of the level of circulating cytokines, disturbance of the function of platelets, that is associated with the changes in the system L-arginine/nitrogen oxide [168, 245]. Activation of the processes of peroxide oxidation of lipids (POL) in conjunction with

the disturbance of nitrogen oxide (NO) metabolism is one of the mechanisms of alteration of the functioning of kidneys under conditions of chronic renal failure (CRF) [200].

The aim of research was to evaluate the functional state of the system L-arginine/NO-synthase/arginase and peculiarities of oxidative processes in patients with CRF of different etiology under conditions of hemodialysis.

The examinations were conducted on the base of nephrologic department of Lviv Regional Clinical Hospital and dialysis station "DIAVERUM" (Lublin, Poland). Totally 99 patients were examined, from whom 42 – with CRF caused by glomerulonephritis, 20 - with type 2 diabetes mellitus. 37 patients were examined at the dialysis station "DIAVERUM" (Lublin, Poland). The comparison group included 20 donors, average age – 48 years.

The patients were examined due to general principles of bioethics, approved by the International Congress of Bioethics (Kiev, 2000) and Commission on Bioethics of Danylo Halytsky Lviv National Medical University, protocol № 1 of January 20th, 2014.

Conducted studies determined the changes of the activity of NO-synthase system, processes of lipid peroxidation and antioxidant defense, substantiated practical approaches to complex therapy of patients with CRF before and after hemodialysis.

In patients with CRF of different etiology for the first time the peculiarities of the state of L-arginine/NO-synthase/arginase system were characterised in complex with the evaluation of the levels of its vasoactive modulators (hydrogen sulphide, catecholamines, ADMA and SDMA) in blood plasma and lymphocytes lysate. It was documented that in patients with CRF, the dysfunction of the system L-arginine/NO-synthase/arginase occurs, what was concluded based on the decrease of the level of L-arginine (for 33%, $p < 0.01$), H₂S for 23% ($p < 0,05$), 2.3-fold increase of the level of metabolic inhibitors of NO-synthase – ADMA ($p < 0,01$) and SDMA – 3.4-fold ($p < 0.01$), noradrenaline concentration – 2.3-fold ($p < 0,001$), sum of NO₂⁻

+NO₃⁻ (2,2-fold) in blood plasma compared to group of donors. Increase of the level of lipid peroxidation processes in blood plasma and lymphocytes lysate was revealed – TBA-active products content increased for 34% (p<0,05), accompanied by the decrease of vitamin C concentration, both its total (for 41%, p<0,05) and oxidised form (for 22%, p<0,05).

In lymphocytes lysate before hemodialysis concentration of L-arginine was 31% lower (p<0,05), level of iNOS activity increased (15-fold, p<0,01), whereas the level of eNOS activity decreased (for 70%, p<0,05); arginase activity had tendency to decrease (for 14%); TBA-active products content increased (for 23%, p<0,05); SOD and catalase activity decreased (for 19% and 44%, p<0.05, relevantly) compared to indices of the group of donors. In CRF patients on the background of diabetes mellitus type 2, level of iNOS activity in lymphocytes lysate before hemodialysis was significantly lower (6,5-fold, p<0,01), and eNOS activity was higher (for 20%). It was proven that hemodialysis session in CRF patients caused the decrease of L-arginine content for 20% in blood plasma, H₂S – for 12% (p<0,05), ADMA and SDMA concentration - for 49% (p<0,05) and 48% (p<0,05) relevantly, noradrenaline content for 24% (p<0,001) compared to indices before hemodialysis.

In lymphocytes lysate after hemodialysis session, L-arginine concentration decreased for 30% (p<0.05), nitrite-anion for 21% (p<0.05), iNOS activity (14-fold, p<0,01) and eNOS activity (8-fold, p<0,01), stating about the influence of hemodialysis session on the system L-arginine/NO-synthase/NO in lymphocytes. In CRF patients on the background of diabetes mellitus type 2 after hemodialysis, iNOS activity decreased less significantly (3,3-fold, p<0.01) compared to CRF patients on the background of glomerulonephritis.

It was proven that in lymphocytes lysate of CRF patients after hemodialysis compared to indices before hemodialysis, level of TBA-active products decreased (for 22%, p<0,05); H₂S content decreased (for 23%); SOD activity was lower (for 25%, p<0,05), catalase activity for 65% (p<0,05), GP activity did not change compared to control group indices.

Evaluated changes of nitroso-oxidative processes after hemodialysis in lymphocytes lysate of patients with CRF and diabetes mellitus type 2 show that the level of iNOS activity decreased 3.6-fold ($p < 0.01$), eNOS activity decreased 2-fold; changes of L-arginine concentration, nitrite-anion and sum of $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ did not have significant change compared with relevant indices of patients with CRF without diabetes mellitus. Concentration of H_2S decreased less significantly – for 11%, whereas in patients with CRF – for 23%, TBA-active products content in lymphocytes lysate returned to initial indices compared to parameters before hemodialysis. Comparing changes of SOD and catalase activity in lymphocytes lysate of CRF patients with and without diabetes mellitus it was concluded that catalase activity is more sensitive to hyperglycemia.

The practical significance of the work is associated with the deepening of ideas about the effect of hemodialysis session on the constituents of the system L-arginine/NO-synthase/arginase, levels of hydrogen sulphide, catecholamines and vitamin C in patients with CRF of different etiology.

Obtained results are the background for the optimisation of treatment of CRF patients with endothelial dysfunction taking into account decrease of the content of L-arginine, hydrogen sulphide, vitamin C and increase of the level of noradrenaline, ADMA and SDMA in blood plasma.

Determined changes of the activity of NO-synthase, arginase and level of L-arginine in lymphocytes lysate resulted in the method of diagnosis of the severity of the condition of patients with CRF “Method of prognosis of the condition of patients with diabetic nephropathy under conditions of hemodialysis” (Patent of Ukraine for the useful model № 110109).

Results of the thesis were introduced into the educational process of the departments of biochemistry of Ternopil State Medical University n.a. I.Y. Gorbachevsky, Ukrainian Medical Dentistry Academy and Danylo Halytsky Lviv National Medical University.

Key-words: chronic kidney disease, hemodialysis, NO-synthase, L-arginine, arginase, peroxide oxidation of lipids, vitamin C, catecholamines.

Список публікацій здобувача

1. Іваночко Р. Б., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Зміни показників системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2014. № 1. С. 66-71 (Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично опрацювала, підготувала публікацію до друку).

2. Іваночко Р. Б., Склярів О. Я. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // Медична біохімія. 2014. № 2. С. 26-30 (Дисертантка провела визначення біохімічних показників, проаналізувала та узагальнення одержаних результатів, статистично опрацювала, підготувала публікацію до друку).

3. Іваночко Р. Б. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з діабетичною нефропатією до та після сеансу гемодіалізу // Український журнал нефрології та діалізу. 2015. № 3. С. 53-57.

4. Іваночко Р., Дзідзік М., Сольські Я., Склярів О. Вплив гемодіалізу на рівень катехоламінів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2016. № 1. С. 67-74 (Дисертантка проаналізувала літературу, взяла участь у аналізі результатів дослідження катехоламінів, підготувала публікацію до друку).

5. Ivanosko R. B., Sklyarov O. Ya., Hutnyk I.N. The changes of indices of L-arginine/nitricoxide/arginase system and oxidative processes in blood plasma in patients with diabetic nephropathy before and after hemodialysis// Sciences of

Europe. 2016. N3. P. 12-15 (Дисертантка провела визначення біохімічних показників, статистично опрацювала результати, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготувала публікацію до друку).

6. Іваночко Р. Б. Пат. № 110109 України, МПК G01N 33/48 (2006.01). Спосіб прогнозування стану хворих з діабетичною нефропатією за умов гемодіалізу; патентовласник Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. – №u201603129; заявл. 23.05.2016, опубл. 26.09.2016, Бюл. № 18.

7. Ivanocko R.R., Biletska L., Sklyarov A. The content of L-arginine, Vitamin C and arginase activity in blood plasma and lymphocytes lysate in patients with chronic kidney disease before and after hemodialysis // 7th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, 23-24 May, 2013, Lviv, Ukraine. 2013. P. 59. (Дисертантка проаналізувала літературу, визначила вміст L-аргініну, вітаміну С, активність аргінази, статистично опрацювала результати, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготувала публікацію до друку).

8. Іваночко Р. Б., Склярів О. Я. Зміни концентрації L-аргініну, нітрогену оксиду та активності аргінази у плазмі крові та лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // The Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86, N 5, suppl. 2. С. 75–76 (Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., м. Київ) (Дисертантка проаналізувала літературу, провела біохімічні дослідження, опрацювала результати, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготувала публікацію до друку).

9. Іваночко Р. Б. Вплив сеансу гемодіалізу на систему NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015: тези доп. конференції-конкурсу молодих учених (м. Київ, 23-24 квітня 2015 р.). К., 2015. С. 29.

10. Іваночко Р. Б. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа і

оксидативних процесів у лімфоцитах хворих, які отримують замісну ниркову терапію // Третя міжнар. наукова конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015 р. Дніпропетровськ : Арбуз, 2015. С. 122-123.

ЗМІСТ

	Стор.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	23
1.1 Роль системи L–аргінін/NO-синтаза/аргіназа у хворих з хронічною нирковою недостатністю	23
1.2 Роль системи L–аргінін/NO-синтаза/аргіназа у формених елементах крові у хворих з хронічною нирковою недостатністю ..	33
1.3 Роль процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту при патології нирок	36
1.4 Біохімічні зміни за умов нефропатії та цукровому діабеті	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	46
2.1 Клініко-лабораторна характеристика хворих з хронічною нирковою недостатністю	46
2.2 Характеристика пацієнтів обстежених на базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща)	49
2.3 Методика виконання гемодіалізу	51
2.4 Біохімічні та лабораторні методи досліджень	53
2.4.1 Методика отримання плазми крові та лізату лімфоцитів.....	54
2.4.2 Методика визначення активності NO-синтази у лізаті лімфоцитів	54
2.4.3 Методика визначення активності аргінази	55
2.4.4 Методика визначення вмісту нітрит-аніона	56
2.4.5 Методика визначення концентрації L-аргініну	57
2.4.6 Методика визначення асиметричного диметиларгініну та симетричного диметиларгініну	57
2.4.7 Методика визначення суми нітратів та нітритів	57

	13
2.4.8 Методика визначення вмісту ТБК-активних продуктів	58
2.4.9 Методика визначення активності супероксиддисмутази	59
2.4.10 Методика визначення активності каталази	59
2.4.11 Методика визначення активності глутатіонпероксидази	60
2.4.12 Методика визначення активності мієлопероксидази	60
2.4.13 Методика визначення вмісту окиснених ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL)	61
2.4.14 Методика визначення вмісту гідроген сульфїду	61
2.4.15 Визначення концентрації вітаміну С у плазмі крові	62
2.4.16 Методика визначення вмісту катехоламінів	63
2.4.17 Методика визначення концентрації білка	63
2.4.18 Лабораторні методи досліджень	64
2.4.19 Статистичні методи досліджень	64

РОЗДІЛ 3 РОЛЬ СИСТЕМИ L-АРГІНІН / НІТРОГЕНУ ОКСИД /АРГІНАЗА, ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ, АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ, ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ ТА КАТЕХОЛАМІНІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ХВОРИХ З ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ДО ТА ПІСЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ	65
3.1 Зміни активності системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, вмісту гідрогену сульфїду, оксидативних процесів та активності ензимів антиоксидантного захисту у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу.....	66
3.2 Зміни оксидативних процесів, активності ензимів антиоксидантного захисту та вмісту вітаміну С у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу	72
3.3 Вплив гемодіалізу на рівень катехоламінів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю	77

3.4 Зміни активності системи L-аргінін / нітрогену оксид /аргіназа, гідрогену сульфїду та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу	81
РОЗДІЛ 4 РОЛЬ СИСТЕМИ L-АРГІНІН / НІТРОГЕНУ ОКСИД /АРГІНАЗА ТА ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ ЛІЗАТІ ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ З ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ДО ТА ПІСЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ	91
4.1 Зміни активності системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, гідрогену сульфїду та оксидативних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу	91
4.2 Зміни активності системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, гідрогену сульфїду та оксидативних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом до та після гемодіалізу	98
РОЗДІЛ 5 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	106
ВИСНОВКИ	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	122
ДОДАТКИ	149

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДМА	– асиметричний диметиларгінін
АМПАМТ	– S-аденозилметіонінпротеїнаргінін метилтрансфераза
АМСГ	– фактор клітинної адгезії молекул
АТ II	– ангіотензін II
ГД	– гемодіаліз
цГМФ	– циклічний гуанозинмонофосфат
ДН	– діабетична нефропатія
ЗНТ	– замісна ниркова терапія
ІЛ-1	– інтерлейкін-1
ІЛ-6	– інтерлейкін-6
ІЛ-18	– інтерлейкін-18
РАС	– ренін-ангіотензинова система
РФП	– радіофармпрепарати
СДМА	– симетричний диметиларгінін
СОД	– супероксиддистутаза
ХНН	– хронічна ниркова недостатність
ЦД	– цукровий діабет
СТGF	– фактор росту сполучної тканини
iNOS	– індукцибельна NO-синтаза
eNOS	– ендотеліальна NO-синтаза
H ₂ S	– гідроген сульфід
MCP-1	– хемоатрактантний білок-1 моноцитів
NO ₂ ⁻	– нітрит аніон
OxLDL	- окиснені ліпопротеїни низької щільності
TGF-бета	– трансформуючий фактор росту-бета
TNF-alpha	– фактор некрозу пухлини альфа

ВСТУП

Актуальність теми. Останнім часом значну увагу приділяють вивченню зв'язку між прогресуванням хронічної хвороби нирок та розвитком різноманітних ускладнень, які пов'язані зі змінами системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативним стресом [50, 104, 199]. За хронічної ниркової недостатності (ХНН) активація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та порушення в системі L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа інтегровані в механізми формування ендотеліальної дисфункції, гіпертензії, зростання рівня циркулюючих цитокінів, порушення функціонального стану тромбоцитів [200, 235, 245].

Уремія є провідним чинником, що викликає зміни активності NO-синтази ендотеліоцитів судин та клітин паренхіми нирок і, в подальшому, зумовлює розвиток патологічних змін у серцево-судинній системі хворих з ХНН [11, 19, 52, 172]. Існують дані, що за ХНН дисбаланс в системі L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа може формуватись і у наслідок гіперпродукції ендогенних аналогів аргініну – асиметричного диметиларгініну (АДМА) та симетричного диметиларгініну (СДМА), що має негативне прогностичне значення [94, 105, 230].

За умов ХНН потенційними чинниками формування дисфункції системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа можуть виступати зміни продукції інших вазоактивних регуляторів, таких як гідроген сульфід та катехоламіни. Адже гідроген сульфід є біологічно-активним агоністом системи NO щодо регуляції судинного тонуусу й синтезу нітрозотіолів [95, 142], рівень якого знижується у пацієнтів з уремією [102]. Катехоламіни, поряд із прямою вазорегулюючою дією, також опосередковано впливають на активність ендотеліальної NO-синтази [85, 163].

У хворих з ХНН змінюються біохімічні процеси у лімфоцитах крові, які відіграють суттєву роль у підтриманні імунологічного статусу організму, що

зумовлено їх фагоцитарною активністю, синтезом про- та антизапальних цитокінів, вивільненням NO за участі індукцибельної NO-синтази [80, 87, 125]. Також лімфоцитарні клітини здатні до продукції гідроген сульфідіду [124, 140]. Роль вказаних чинників у пацієнтів з ХНН різної етіології на тлі гемодіалізу може суттєво модифікуватись. З цієї точки зору особливої уваги вимагають хворі з діабетичною нефропатією та артеріальною гіпертензією, у яких засвідчені розлади метаболізму NO та зростання оксидативних процесів [36].

Таким чином, оцінка змін рівнів вазоактивних регуляторів (NO, гідроген сульфідіду, катехоламінів, АДМА та СДМА), особливостей функціонування системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та перебігу оксидативних процесів у лімфоцитах та плазмі крові хворих на ХНН різного генезу до та після гемодіалізу залишається пріоритетним завданням медичної біохімії.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є фрагментом комплексної теми кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького "Клініко-експериментальне обґрунтування моніторингу, діагностики та стандартизованих методів лікування метаболічних захворювань внутрішніх органів та їх ускладнень", ІН. 25.01.0001.10, держреєстр.0110U001641. Дисертант дослідила стан NO-синтазної системи, активність процесів ліпопероксидації, ензимів антиоксидантного захисту, оцінила рівні катехоламінів у хворих з ХНН до та після сеансу гемодіалізу.

Тема кандидатської дисертації затверджена на засіданні Вченої ради фармацевтичного факультету Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України 26 березня 2014 року, протокол № 7.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було з'ясувати функціональний стан системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та особливості оксидативних процесів у хворих з хронічною нирковою недостатністю різної етіології за умов гемодіалізу.

Для досягнення мети були визначені наступні **задачі**:

1. Дослідити особливості стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у плазмі крові та лімфоцитах хворих з ХНН різної етіології (гломерулонефрит, діабетична нефропатія) до та після гемодіалізу.
2. Встановити зміни рівнів модуляторів стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа (асиметричного й симетричного диметиларгініну) у плазмі крові хворих з ХНН до та після гемодіалізу.
3. Дослідити зміни рівня вазоактивного агоніста системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа – гідроген сульфід у плазмі та лімфоцитах хворих з ХНН до та після гемодіалізу.
4. Встановити зміни рівнів катехоламінів (адреналіну, норадреналіну, дофаміну) в плазмі крові хворих з ХНН до та після гемодіалізу.
5. Дослідити активність процесів ліпопероксидації та стан системи антиоксидантного захисту (за активністю СОД, каталази, глутатіонпероксидази, рівнем вітаміну С) в плазмі крові та лімфоцитах хворих з ХНН до та після гемодіалізу.

Об'єкт дослідження – функціональний стан системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та перебіг оксидативних процесів за хронічної ниркової недостатності.

Предмет дослідження – показники стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа (рівні L-аргініну, метаболітів NO, активність аргінази, eNOS, iNOS), зміни рівнів модуляторів стану системи NO (асиметричного та симетричного диметиларгініну, гідрогенсульфід, катехоламінів), показники ліпопероксидації та антиоксидантної системи у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих з ХНН до та після гемодіалізу.

Методи дослідження. У роботі використані біохімічні, лабораторні, інструментальні, статистичні методи досліджень з метою визначення зміни активності NO-синтазної системи, процесів ліпопероксидації та антиоксидантного захисту, гідроген сульфід та катехоламінів у сироватці крові

та лізаті лімфоцитів у хворих з ХНН до та після гемодіалізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше у хворих з ХНН різної етіології охарактеризовані особливості стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у комплексі з оцінкою рівнів її вазоактивних модуляторів (гідроген сульфід, катехоламінів, АДМА та СДМА) у плазмі крові та лізаті лімфоцитів. Засвідчено, що у хворих на ХНН на тлі уремії виявляється дисфункція системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа, про що свідчить зниження рівня нітрит-аніону, L-аргініну, зростання рівня метаболічних інгібіторів NO-синтази (АДМА та СДМА), зниження рівня гідроген сульфід (агоністу NO) у плазмі крові. Після сеансу гемодіалізу у хворих на ХНН зниження рівня уремії поєднувалось із більш виразним зниженням в плазмі крові концентрації L-аргініну, нітрит-аніона, АДМА та СДМА, гідроген сульфід, активності аргінази. У хворих з ХНН до сеансу гемодіалізу виявлялись ознаки активації процесів ПОЛ зі зростанням рівня ТБК-активних продуктів та зниженням рівня вітаміну С в плазмі крові, а після гемодіалізу спостерігалось зниження вмісту ТБК-активних продуктів та поглиблювався дефіцит вітаміну С.

У хворих на ХНН виявлявся дисбаланс обміну катехоламінів, про що свідчить значне підвищення в плазмі крові концентрації норадреналіну, в той час як концентрація адреналіну та дофаміну суттєво не змінювалась (відносно показників контрольної групи). Не виявлено статистично вагомих відмінностей концентрації катехоламінів в крові у хворих на ХНН залежно від статі.

Розвиток вазоконстрикції у хворих з ХНН обумовлений з однієї сторони зростанням виділення норадреналіна, а з другої - зниженням продукції місцевих регуляторних вазодилітаторів - NO та гідроген сульфід.

У плазмі крові хворих на ХНН на тлі діабетичної нефропатії, пов'язаної із цукровим діабетом 2-го типу, зміни основних показників нітрозоксидативних процесів та системи антиоксидантного захисту за спрямованістю були подібними до відповідних змін у хворих на ХНН на тлі гломерулонефриту. При цьому у хворих з ХНН на тлі діабетичної нефропатії

відзначалось у меншій мірі зростання сумарного рівня нітритів та нітратів ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) та менший рівень активності каталази у плазмі крові; після сеансу гемодіалізу відзначено зниження рівня активності каталази, зростання активності СОД та зниження сумарного рівня $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$.

У лізаті лімфоцитів хворих на ХНН відзначено зростання вмісту ТБК-активних продуктів, активності іNOS, зменшення активності еNOS та вмісту L-аргініну у порівнянні з контрольною групою. Сеанс гемодіалізу спричиняв значне зниження активності іNOS та еNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніону у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН.

Практичне значення одержаних результатів. Результати дослідження поглиблюють уявлення щодо впливу сеансу гемодіалізу на складові системи системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа, рівні гідроген сульфід, катехоламінів та вітаміну С у хворих з ХНН різної етіології.

Встановлено, що до метаболічних чинників, які можуть прискорювати формування ендотеліальної дисфункції та погіршувати перебіг оксидативних процесів після сеансу гемодіалізу у хворих з ХНН поряд із дисфункцією системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа належить формування дефіциту L-аргініну, гідроген сульфід, вітаміну С і зростання рівнів норадреналіну, АДМА та СДМА у плазмі крові. Отримані результати є підґрунтям для оптимізації метаболічної підтримки хворих на ХНН після сеансу гемодіалізу шляхом фармакологічної корекції рівнів L-аргініну та вітаміну С у перспективі.

Визначені зміни активності NO-синтази, аргінази та рівня L-аргініну у лізаті лімфоцитів лягли в основу нового способу діагностики важкості стану хворих з ХНН «Спосіб прогнозування стану хворих з діабетичною нефропатією за умов гемодіалізу» (патент України на корисну модель № 110109).

Результати дисертації впроваджені у навчальний процес кафедр біохімії ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені Я.І. Горбачевського” МОЗ України, ВДНЗ України “Українська медична стоматологічна академія” МОЗ України, Львівського національного медичного

університету імені Данила Галицького МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Автор виконав весь обсяг експериментальної частини роботи на базі кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, особисто провів аналіз, підготував наукові праці до друку, зробив статистичні обчислення отриманих результатів, оформив дисертаційну роботу. Планування напрямів досліджень, обговорення їх результатів, формулювання висновків здійснено разом з науковим керівником д.мед.н., проф. О.Я. Складарим. Біохімічні дослідження проведені спільно з к.б.н. Білецькою Л.П. Визначення катехоламінів та похідних L-аргініну (СДМА та АДМА) було проведено на кафедрі клінічної аналітики Люблінського медичного університету спільно з проф. Я. Сольські. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу у проведенні досліджень, участь яких у виконанні роботи зафіксована у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на: 7-й Львівсько-Люблінській конференції (Львів, 2013), з'їзді Українського Біохімічного Товариства (Київ, 2014); конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня 2015); третій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015), науково-практичній конференції «Нефрологія і діаліз: up to date» (Чернівці, 8-9 жовтня 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 друкованих праць: 5 статей (4 – у фахових наукових виданнях, 1 – у зарубіжному виданні), 4 роботи – у збірниках матеріалів вітчизняних та міжнародних наукових з'їздів і конференцій, один патент на корисну модель.

Обсяг та структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 156 сторінці комп'ютерного набору (з них 121 сторінок основного змісту), складається зі вступу, огляду літератури, методик досліджень та загальної

клінічної характеристики хворих, чотирьох розділів з результатами власних досліджень та обговорення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури (229 найменувань, з яких 57 кирилицею і 172 латиницею) та додатків. Робота містить 19 таблиць і 17 рисунків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Роль системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у хворих з хронічною нирковою недостатністю

Хронічна ниркова недостатність (ХНН) є однією з ключових патологій, що супроводжується значним зниженням якості життя та високою смертністю. У хворих яким діагностовано термінальну стадію ниркової недостатності основним методом лікування являється замісна ниркова терапія (ЗНТ), завдяки якій забезпечується продовження тривалості життя. При цьому, однією із основних причин, що викликає високу частоту летальності у хворих на ХНН V стадії, які отримують ЗНТ методом гемодіалізу, є оксидативний стрес [35, 36, 40].

У основі розвитку хронічної хвороби нирок лежать первинні ураження гломерулярного апарату. На сьогоднішній день ХНН розглядають не тільки як місцеве ураження ниркових структур, але і як загальне захворювання організму, при якому порушуються не тільки всі види обміну речовин, але і виникає дисфункція ендотеліоцитів, яка викликає порушення серцево-судинної системи [5, 11, 51, 55, 164].

Значну роль в ініціації та прогресуванні дисфункції ендотеліоцитів відіграють дисрегуляторні зміни у системі системи L-аргінін/ NO-синтаза / аргіназа. У хворих на ХНН порушується баланс між L-аргініном та NO, що характеризується зниженням синтезу NO, внаслідок зменшення вмісту у крові амінокислоти L-аргініну, яка є субстратом для NOS, та підвищується продукція та виділення у кров ендогенного інгібітора NOS - асиметричного диметиларгініну (АДМА) [78, 83]. У пацієнтів з ХНН пошкодження ендотелію капілярної системи нирок вважаються центральним фактором у прогресивному ушкодженні нирок.

Серед ключових патохімічних процесів, що лежать у розвитку ХНН є підвищення рівня процесів ліпопероксидації, внаслідок виникнення місцевого запального процесу, який супроводжується активацією прозапальних ензимів (NO-синтази, циклооксигенази), зростання вмісту кисневих радикалів, пероксинітриту, прозапальних цитокінів, токсичних продуктів обміну, які у свою чергу підтримують та посилюють розвиток оксидативно-нітративного стресу [116].

ХНН характеризується ендотеліальною дисфункцією, гіпертонією, зростанням рівня циркулюючих цитокінів, зміною функцій тромбоцитів, що асоціюється з порушенням системи L-аргінін-нітрогену оксид [71, 122, 158, 161, 162, 173, 227]. За розвитку ХНН у крові підвищується концентрація азотовмісних продуктів обміну (креатиніну, сечовини, сечової кислоти), що викликає уремію. Зміни вмісту нітрогену оксиду у плазмі крові за умов уремії у хворих з ХНН є неоднозначні – одні автори вказують на його зниження [71, 112, 116], інші – на зростання [71, 122, 158, 162, 227].

Нітрогену оксид (NO) – газовий медіатор, що регулює значну кількість важливих функцій клітини, як за фізіологічних умов, так і патологічних процесах [199]. За участі NO живому організмі проходить регуляція фізіологічних процесів, таких як: вазодилатація, нейротрансмісія, агрегація тромбоцитів, реакція імунної системи, регуляція тонуусу гладких м'язів та багатьох інших, а також він є провідним чинником розвитку запалення та канцерогенезу [134, 186].

В організмі людини та тварин є два основні шляхи утворення NO: ензиматичний та неензиматичний. Ензиматичний синтез NO є основним і здійснюється за участю ензиму NO-синтази (NOS, 1.14.13.39), який за наявності молекулярного кисню та $\text{NADPH}\cdot\text{H}^+$ каталізує перетворення амінокислоти L-аргініну до NO та L-цитруліну [96].

Іншим джерелом неензиматичного утворення NO є нітрити плазми крові. Так, зміна рН середовища в кислу зону (наприклад, при ішемії, запаленні)

спричинює реакцію відновлення нітриту з утворенням NO. Також, неензиматично NO може вивільнятися за умов гіпоксії шляхом відновлення нітратів до нітритів, з наступним відновленням нітритів до NO у присутності гемовмісних протеїнів, які мають нітритредуктазну активність [24].

Після реалізації сигнальної функції NO може переходити у плазму, проникати крізь мембрану еритроцитів та зв'язуватись з гемоглобіном. У залежності від стану насичення крові киснем за взаємодії NO з гемоглобіном утворюються нітрати та метгемоглобін, нітрозилгемоглобін та S-нітрозогемоглобін. У процесі деоксигенації гемоглобіну та під час гіпоксії, S-нітрозогемоглобін є джерелом неензиматичного утворення NO. Присутність окисників також підсилює вивільнення NO із нітрозилгемоглобіну [160]. Незначна кількість NO уникає захоплення гемоглобіном і реагує з компонентами плазми з утворенням нітритів, нітроліпідів та продуктів нітрузування/нітрозилування, які є сумою S-нітрозотіолів, N-нітрозамінів та Fe²⁺-нітрозильних комплексів. Кожен із цих продуктів здатний зберігати, транспортувати і виділяти NO поза місцем його синтезу, виконуючи функцію депо NO [211].

Не дивлячись на те, що основним субстратом для синтезу NO є L-аргінін, іншими джерелами можуть бути L-гомоаргінін, N^G-метил-L-аргінін. Амінокислоту L-аргінін відносять до незамінних амінокислот, необхідних для сперматогенезу, ембріонального та фетального розвитку, росту й розвитку плода, регуляції артеріального тиску, підтримання судинного тонуусу та гемодинаміки. L-аргінін у організмі людини приймає участь у синтезі багатьох речовин: білків, креатиніну, сечовини, піримідинових основ; є прекурсором для синтезу нітрогену оксиду, агмантину та поліамінів, а також має антипроліферативну дію [77, 97, 166, 222].

L-аргінін потрапляє в організм з харчовими продуктами (білками) та синтезується в організмі людини з L-цитруліну у нирках та печінці (рис. 1.1).

Рисунок 1.1 – Обмін L-аргініну у клітинах ссавців [182].

L-аргінін, який синтезується у печінці, у цьому ж органі і метаболізується та не вносить значного внеску на рівень циркулюючого L-аргініну у плазмі крові. При ряді патологій синтез L-аргініну знижується та зростають процеси катаболізму, за цих умов L-аргінін стає незамінною амінокислотою для організму [77, 176].

Концентрація L-аргініну у плазмі крові коливається у межах 80-120 мкмоль/л і залежить від його поступлення з харчовими продуктами (1-2 г/доба) та рівнем синтезу у проксимальних канальцях нирок [71]. Недостатнє харчування часто є супутнім фактором у хворих з ХНН та проявляється зниженням концентрації у плазмі крові амінокислот, у тому числі і L-аргініну [239].

Було показано, що у плазмі крові хворих з ХНН концентрація L-аргініну є значно нижчою, ніж у пацієнтів контрольної групи. Тоді як концентрація L-орнітину в плазмі крові хворих з ХНН була підвищена [216]. Іншими дослідженнями було відзначено, що концентрація L-аргініну, L-орнітину та L-лізину у пацієнтів з ХНН була знижена, а концентрація L-цистеїну та L-глутамату різко підвищена [205].

Процес перетворення L-аргініну у NO здійснюється NO-синтазою, що локалізується у цитоплазмі багатьох клітин, у тому числі епітеліоцитах нефронів, ендотеліоцитах судин, лімфоцитах тощо. На сьогоднішній день ідентифіковано три ізоформи NO-синтаз, дві з яких є кальційзалежними і відносяться до конститутивних – ендотеліальна (eNOS) та нейрональна (nNOS), третя – індукцйбельна кальційнезалежна (iNOS), активація якої відбувається за участю прозапальних цитокінів та мікробних ліпополісахаридів [77].

Структура NOS є досить складною і включає два домени: NH₂-кінцевий домен, який зв'язує L-аргінін та COOH-кінцевий редуктазний домен, який передає електрони на NH₂-домен і містить сайт для зв'язування динуклеотидфосфату нікотинаміду аденіну; протопорфіринове залізо та ряд кофакторів – ФАД, ФМН, 5,6,7,8-L-біоптерин [190, 225].

Синтез NO клітинами відбувається з амінокислоти L-аргініну за участю Ca²⁺-залежних eNOS та iNOS, які забезпечують внутрішньоклітинний рівень NO, який необхідний для функціонування клітин за фізіологічних умов [20].

У нирках NO синтезується у ендотеліальних, мезангіальних, епітеліальних клітинах. У нирках відзначена наступна локалізація NO-синтаз: eNOS - у ендотеліальних клітинах судин, гломерулярному апараті, мезангії, аферентних артеріолах нирок; nNOS – у ендотеліальних клітинах судин, аферентних артеріолах, нервових волокнах. При патологічних станах, ішемії, вазоконстрикції, запаленні відзначається різке зростання активності iNOS, що викликає посилення продукції NO [75, 77].

Іншими ензимами, що метаболізують L-аргінін є: аргіназа, аргініндекарбоксилаза, аргінін-гліцин-амідиотрансфераза. Аргіназа (КФ 3.5.3.1) гідролітично розщеплює L-аргінін до L-орнітину і сечовини. Розрізняють два типи аргінази – перший тип експресується у цитоплазмі гепатоцитів і значно менше в ентероцитах, ендотеліальних, епітеліальних клітинах, макрофагах [180, 181, 182]. Другий тип аргінази на незначному рівні експресується у мітохондріях клітин нирок, судин, м'язів, нейронів і відіграє

значну роль у регуляції синтезу проліну, поліамінів, нітрогену оксиду та не бере участі у циклі сечовини. Аргіназний шлях розщеплення аргініну у гепатоцитах більш інтенсивний, ніж його метаболізм NO-синтазою [196, 198].

Аргініндекарбоксилаза перетворює L-аргінін в декарбоксильовану сполуку – агматин (1-(4-амінобутил)гуанідин). За своєю природою агматин є катіонним поліаміном, який широко поширений в різних типах клітин і тканин та виконує ряд важливих фізіологічних функцій як нейромедіатор і/або нейромодулятор [221, 244].

Синтезований NO-синтазою нітрогену оксид може викликати вплив на чисельні процеси як у клітині де він був синтезований, так і на навколишні клітини, що обумовлено його значною дифузійною здатністю внаслідок низької молекулярної маси та високої гідрофільності. Механізм дії NO може бути пов'язаний з цГМФ та незалежним від нього [183]. При патологічних станах відбувається різке збільшення продукції NO, дія якого здійснюється за рахунок цГМН-незалежного шляху [43].

Утворений нітрогену оксид може взаємодіяти з різними молекулами гуанілациклазою, гемоглобіном, мітохондральними ферментами, ферментами циклу Кребса, ферментами синтезу білка і ДНК [10]. Зв'язування NO із залізом, що входить до складу ряду ензимів, призводить до різних ефектів: цитотоксичної дії макрофагів; розслаблення м'язів судин і зміни ниркового кровообігу; змін процесів перенесення кисню та окислення АТФ. Важливою мішенню з якою взаємодіє NO є білки, які містять SH-групи. Окрім цього, NO приймає участь у регуляції синтезу білка у клітині. Зростання продукції NO є одним з факторів підвищення процесів ліпопероксидації внаслідок його взаємодії з активними форма кисню результатом чого є утворення пероксинітриту ($\text{ONOO}\cdot$). Останній будучи токсичною сполукою може активувати внутрішньосудинне згортання крові, викликати септичний шок та тромбоутворення [23].

У хворих з ХЗН пероксинітрит модифікує залишки тирозину в білках з

утворенням нітротирозину, що викликає пошкодження функцій білків [184, 203]. Високі рівні нітротирозину було виявлено в тубулярному епітелії та зовнішній зоні мозкової речовини при моделюванні хронічної гіпоксії в тканинах нирки. При ХЗН виявлено підвищені рівні нітразування тирозину у структурі супероксиддисмутази (Mn-SOD) [128].

Вважається, що за умов ішемії ниркових каналців відбувається зростання синтезу NO за участю eNOS, що знижує рівень постішемичних метаболічних і функціональних порушень. Основним фактором, який знижує реалізацію цього захисного механізму є недостатній рівень L-аргініну та зростання активності iNOS, що призводить до утворення пероксинітрида та цитотоксичного ефекту на клітини епітеліоцитів нирки [33].

Нітрогену оксид є важливим регулятором функціонального стану серцево-судинної системи. Одним з основних ефектів дії NO на гладкі м'язи судин є його вазодилататорний вплив. Реалізується вазодилатація за участю NO, що синтезується eNOS ендотеліальних клітин. Активність eNOS зростає при підвищенні цитоплазматичної концентрації іонів Ca^{2+} , що призводить до перетворення L-аргініну у нітрогену оксид, останній при взаємодії з цГМФ викликає зростання рівня цГМФ-залежних протеїназ, внаслідок чого знижується концентрація внутрішньоклітинного кальцію та відбувається розслаблення клітин гладких м'язів судин. Частина NO, що синтезувалась у ендотеліоцитах може дифундувати у кровотік, взаємодіяти з гемоглобіном з утворенням NO-гемоглобіну та незначної кількості метгемоглобіну [73, 233].

У крові нітрогену оксид гальмує оксидативну модифікацію ліпопротеїнів плазми, знижує адгезію моноцитів до ендотеліальних клітин, знижує проліферацію гладких м'язів судин та активність тромбоцитів [186].

Зниження продукції нітрогену оксиду eNOS ендотеліоцитами судин є ключовим фактором розвитку ендотеліальної дисфункції, що включає виникнення дисбалансу між місцевими процесами гомеостаза, проліферації, міграції клітин крові в судинну стінку, регуляцію судинного тону. Наслідком

ендотеліальної дисфункції є розвиток артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, порушенням функціонування внутрішніх органів та мозку [121, 237].

Встановлено що при артеріальній гіпертензії активується аргіназний та інгібується NO-синтазний шляхи обміну L-аргініну в аорті щурів. Проте у серці, аорті та плазмі активність NOS зменшувалась, тоді як в еритроцитах підвищувалась. Збільшення вмісту NO₂ в еритроцитах свідчить, про участь їх у регуляції тонуусу судин безпосередньо завдяки звільненню NO [16, 51].

У нирках NO приймає активну участь в регуляції процесів внутрішньониркової гемодинаміки, процесів клубочкової фільтрації та реабсорбції. В процес ниркової гемодинаміки залучені nNOS і eNOS, а їхня дисфункція викликає інтрагломерулярну гіпертонію [74].

Зниження синтезу нітрогену оксиду у нирках викликає розвиток ендотеліальної дисфункції, яка при тривалому перебігу може бути причиною ремоделювання судин та навколосудинних структур, що проявляється розвитком мезенхімальної гіпертрофії та змін зовнішньоклітинного матриксу. Дефіцит NO створює умови для патологічного впливу судинноактивних факторів, що є його антагоністами, в тому числі ангіотензину II [111]. Зниження синтезу NO у нирках викликає гіперволемію, підвищення концентрації натрію в крові, погіршення клубочкової фільтрації, розвиток вазоконстрикції, збільшення каналцевої реабсорбції води, що призводить до зростання синтезу ангіотензину II і, відповідно, до підвищення артеріального тиску і у подальшому до розвитку гломерулосклерозу і прогресуванням ниркової недостатності [185].

Зростання артеріального тиску при пошкодженні нирок та на тлі дисфункції ендотелія пов'язано із збільшенням об'єму циркулюючої рідини у кровоносних судинах, затримкою натрію, активацією симпатичного відділу вегетативної нервової системи та порушеннями у ренін-ангіотензин-альдостероновій системі [17, 55, 247].

Надмірна кількість синтезованого NO пошкоджує клітини нирок, тоді як

блокування або недостатність його продукції призводить до посилення запальних процесів і прогресування патологічного процесу у нирках [151]. Гемодіаліз викликав значне зниження концентрації NO у плазмі крові однак через день його рівень піднімався до показників до проведення діалізу [19, 26-31, 47, 138, 156, 157].

Останнім часом все більше уваги приділяється вивченню ролі ендогенних аналогів аргініну таких як L-NMMA, симетричного (СДМА) та асиметричного диметиларгініну (АДМА) за умов ХНН. Згідно попередніх досліджень визначено, що активація процесів ушкодження нирок може бути пов'язана із зниженням синтезу нітрогену оксиду ендотеліальними клітинами внаслідок зростання рівня ендогенних інгібіторів NO-синтази, таких як асиметричний диметиларгінін [62, 127].

АДМА утворюється з аргініну, що включений у ядерні білки, шляхом його метилування ензимом S-аденозилметіонінпротеїнаргінін метилтрансферазою (АМПАМТ). Цей ензим переносить метильну групу з S-аденозилметіоніну до аргініну внаслідок чого утворюються метильований аргінін та S-аденозилгомоцистеїн [84]. Вільний метильований аргінін вивільняється протягом протеолізу та не включається у подальшому у склад білків [241].

Показано, що АДМА гальмує активність трьох ізоформ NO-синтаз за конкурентним механізмом і його ефект є зворотнім за високої концентрації L-аргініну. За умов стресу, гіповолемії, ендотоксимії, м'язовій дистрофії, геморагічному та септичному шоці, ниркової недостатності відбувається зростання експресії та активності АМПАМТ, що призводить до зростання продукції АДМА у ендотеліальних клітинах [84]. Оксидативний стрес також є фактором, що стимулює утворення АДМА [171].

Негативний вплив АДМА пов'язаний з: посиленням адгезії моноцитів, активацією експресії прозапальних та хемотактичних факторів, зростанням вмісту оксимодифікованих ліпопротеїнів у макрофагах [79].

Показано, що у плазмі крові за умов норми концентрація АДМА нижча за один мкмоль і значно зростає у хворих з ХНН [80, 84, 231]. Підвищення вмісту у плазмі крові АДМА розглядають як фактор ризику розвитку атеросклерозу, гіпертригліцеридемії, цукрового діабету, ожиріння, гепергомоцистеїнемії, а також предиктор-фактор гострих кардіоваскулярних порушень у хворих з ХНН [81, 229].

У пацієнтів з ХЗН пошкодження ендотелія в капілярній системі мозкового шару нирок та супутня судинна дисрегуляція призводять до прогресування ураження ниркових клітин, а це в свою чергу викликає порушення азотвидільної функції і до подальшого прогресування ураження ниркової тканини, що безпосередньо викликає виникнення ХНН. В цьому відношенні синтез NO ендотеліальними клітинами за рахунок накопичення ендогенних інгібіторів NO-синтази, таких як АДМА призводить до прискорення прогресування ХНН. Таким чином, зниження рівня АДМА крові може позитивно впливати в клінічних дослідженнях спрямованих на зниження втрати функції нирок у пацієнтів з ХНН [127].

Показано, що у пацієнтів з ХНН відбувається зростання концентрації ендогенних аналогів аргініну таких як L-NMMA, СДМА та АДМА, а також зниження рівня аргініну у плазмі крові, що змінює функціонування системи L-аргінін/NOS/NO [4, 50, 62, 100, 150, 177, 187, 220].

Використання донаторів оксида азоту, перш за все нітратів, у пацієнтів обумовлене інгібуванням активності eNOS, а застосування нітратів нормалізує системи гемостазу та функції ендотелію судин [12]. Використання в комплексному лікуванні стимуляторів синтезу NO дозволяє покращити судинний кровообіг як в клубочках, так і в каналцях, і тим самим запобігти прогресуванню захворювання [60].

Останнім часом ґрунтовно вивчається як у експериментах, так і у клініці інший газовий медіатор – гідроген сульфід (H_2S). У багатьох дослідженнях показано, що H_2S є сигнальною молекулою з вазодилаторними та

нейромодуляторними властивостями [93, 207]. Синтезують H_2S з L-цистеїну або з L-гомоцистеїну декілька ензимів, серед яких цистатіонін-бета синтаза (CBS) та цистатіонін-гама-ліаза є цитоплазматичними та пиридоксаль-5-фосфат залежними, тоді як 3-меркаптопіруват сульфотрансфераза (MST) локалізується у мітохондріях та не є залежна від пиридоксаль-5-фосфату [83].

H_2S приймає участь у процесах розслаблення аорти, портальної вени, мезентеріальної артерії, що свідчить про його фундаментальну роль у регуляції тону судин. Окрім цього, H_2S грає позитивну роль у пацієнтів з ушкодженням міокарду. Екзогенне введення H_2S зменшує адгезію лейкоцитів до ендотеліоцитів [242]. Вазодилататорний ефект H_2S пов'язаний з активацією плазматичних K_{ATP} -каналів; ноцицептивний вісцеральний ефект обумовлений непрямою активацією T-каналів [135]. Вважають, що H_2S володіє антиоксидантними властивостями, може взаємодіяти з активними радикалами, включаючи супероксидний радикал, гідроген пероксид, пероксинітрил, гіпохлорид. H_2S та NO мають синергічний ефект на процеси вазодилатації, H_2S каталізує вивільнення NO з S-нітроглютатіону [135].

У нирках H_2S приймає участь у регуляції базових процесів, таких як гломерулярна фільтрація та реабсорбція іонів натрію. За умов діабетичної нефропатії вміст H_2S у плазмі крові знижувався [126].

1.2 Роль системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у формених елементах крові у хворих з хронічною нирковою недостатністю

Система L-аргінін/ NO-синтаза / аргіназа безпосередньо приймає участь у функціонуванні ендотеліоцитів та лімфоцитів. Продукція NO у клітинах регулюється рядом факторів, серед них: рівнем експресії та активності NO-синтази, вмістом L-аргініну у цитоплазмі, наявністю необхідного кофактора для NO-синтази – тетрагідроapterина, рівня активності аргінази та вмісту ендогенного інгібітора NO-синтази – АДМА [84].

Розвиток та прогресування хронічних запальних захворювань нирок, внаслідок виникнення уремії та зростання процесів ліпопероксидації, супроводжується змінами функціонування формених елементів крові, у тому числі і лімфоцитів. Роль лімфоцитів крові детально вивчається, вони підтримують імунологічний статус організму, що зумовлено їх фагоцитарною активністю, синтезом про- та антизапальних цитокінів, виділенням NO [87].

Стосовно рівня експресії та активності NO-синтази у лімфоцитах, то дані літератури є неоднозначними. Було показано, що неактивовані людські моноцити експресують eNOS та iNOS за фізіологічних умов та при їх стимуляції [192, 218], тоді як у інших дослідженнях активність iNOS та mRNA iNOS у лейкоцитах людей не визначались [191]. За умов дії вірусу Епштейна-Барр на людські лімфоцити був виявлений низький конститутивний рівень iNOS та пригнічення апоптозу NO незалежним від цГМФ механізмом [188].

Також експресують конститутивну та індукцибельну форми NO-синтази тромбоцити [103, 143, 215].

Синтез NO у лімфоцитах залежить від поступлення у їх цитоплазму з плазми крові L-аргініну. Слід відзначити, що концентрація L-аргініну у плазмі крові є вищою, ніж у цитоплазмі лімфоцитів, що обумовлює наявність механізму його транспорту через їх мембрану. Згідно з сьогоденніми поглядами транспорт L-аргініну у еритроцити, лейкоцити та тромбоцити людини периферійної крові опосередковується за участю катіонних амінокислотних транспортних систем y^+ та y^+L [107, 108, 145, 178, 239]. У еритроцитах людини система y^+L володіє більшою спорідненістю до катіонних амінокислот, у порівнянні з іншими амінокислотними транспортерами [106, 107].

Мембранна транспортна система y^+L володіє високою спорідненістю та забезпечує Na^+ -незалежний транспорт катіонних амінокислот та Na^+ -залежний транспорт нейтральних амінокислот [107]. Поступаючий у цитоплазму ендотеліальних клітин та клітин крові L-аргінін за участю системи y^+L є

лімітучим фактором для синтезу нітрогену оксиду [147, 193]. У хворих з ХНН транспорт L-аргініну в клітини крові зростає, тоді як концентрація L-аргініну у плазмі крові знижується [72, 174, 241].

У хворих з ХНН транспорт L-аргініну підвищується у еритроцитах та лейкоцитах периферичної крові, що може вказувати на те, що за умов уремії виникає адаптивне зростання активності катіонної транспортної системи амінокислот у⁺ [174, 206, 208]. Зниження концентрації L-аргініну у плазмі крові врівноважується підвищеною швидкістю його транспорту у еритроцити, що призводить до активації синтезу нітрогену оксиду при уремії [208].

Транспорт L-аргініну та синтез NO є взаємопов'язані [215]. Нітрогену оксид може безпосередньо взаємодіяти з оксигемоглобіном з утворенням нитратів та метгемоглобіну, та з гемоглобіном, утворюючи нітрозилгемоглобін [175]. За умов низького парціального тиску кисню у крові еритроцити можуть вивільняти із зв'язаного стану нітрогену оксид у мікроциркуляторне русло [204].

Доведена важлива роль нейтрофілів в патофізіологічних процесах, що відбуваються при розвитку та прогресуванню ХНН. Попередніми дослідженнями, при обстеженні 38 хворих з ХНН, було показано, що розвиток ХНН супроводжується порушеннями у системі NO-синтаз (NOS) у нейтрофілах - підвищувалась активність iNOS та знижувалась активність конститутивних NO-синтаз (eNOS та nNOS). Використання комплексної терапії з аргінін-Zn приводило до зниження агрегації нейтрофілів і активності iNOS, при цьому підвищувалась активність конститутивних NO-синтаз (eNOS та nNOS) [3].

Слід відзначити, що у лейкоцитах також експресується аргіназа, активність якої порівняно з плазмою крові є майже на одному рівні. Зростання у лімфоцитах активності iNOS призводить до зниження активності аргінази, що обумовлено конкуренцією за субстрат – L-аргінін [1, 15].

При прогресуванні ХНН у хворих на хронічний гломерулонефрит у

залежності від стадії хвороби, також зменшувалась кількість еритроцитів у крові та зростав поканик ШОЕ [54].

У хворих на ХНН, які отримують ЗНТ, після проведення процедури гемодіалізу відбуваються зміни в тромбоцитах, що дозволяє оцінити рівень порушення структури і функціональної активності клітин за умов прогресування ХНН [22].

Аналізуючи дані літератури по змінам NO-синтазної системи у хворих з ХНН слід відзначити необхідність проведення поглиблених досліджень враховуючи вміст катехоламінів у плазмі крові. Відомо, що виділення катехоламінів у кров викликає підвищення артеріального тиску, призводить до ремоделювання артерій, зростання рівня периферійного опору судин та гіпертрофії лівого шлуночка [232, 242]. Щодо змін рівня катехоламінів у крові хворих з ХНН то, по цьому питанню, отримані різні результати – відзначалось як зростання їх концентрації [209, 210, 242], так і відсутність їх змін [113, 232]. Важливим питанням сьогодення є вивчення кооперативних ефектів дії на судинну стінку ключових вазорегуляторів – катехоламінів та газових медіаторів (NO, H₂S).

Недостатньо вивченим є зміни активності системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у циркулюючих лімфоцитах у порівнянні з відповідними показниками плазми. Особливо це стосується показників нітрозоксидативного стресу після сеансу гемодіалізу. Процедура гемодіалізу викликає не тільки звільнення від токсичних продуктів плазми крові, але паралельно виділяються необхідні організму вітаміни та амінокислоти, що потребує поглибленого вивчення з точки зору їх харчової та фармакологічної корекції.

1.3 Роль процесів ліпопероксидації та активності ензимів антиоксидантного захисту при патології нирок

Останнім часом багато уваги приділяють вивченню зв'язку прогресування ХНН та розвитку різноманітних ускладнень з оксидативним

стресом, що характеризується дисбалансом між про- та антиоксидантною системами [167, 199].

ХНН на сучасному розглядають як прооксидантний стан, при якому вторинні продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), утворюючи сполуки із білками, перешкоджають реалізації біологічних функцій цих білків, зокрема знижують активність ферментів, прискорюють розвиток атеросклерозу та підвищують ризик розвитку серцево-судинних ускладнень [5, 40, 155].

ПОЛ – є одним з базових метаболічних процесів, що забезпечує за фізіологічних умов постійне оновлення ліпідного складу клітинних мембран, підтримку активності ліпідзалежних рецепторів, синтез попередників простагландинів, окисне фосфорилування у мітохондріях, фагоцитоз тощо [98]. За фізіологічних умов інтенсивність окисдатовних процесів у клітинах організму невелика, що зумовлено низьким рівнем утворення продуктів ПОЛ та захисною дією компонентів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) [44, 52, 223, 226].

За умов запалення, дії ксенобіотиків, канцерогенезі відзначається надмірне утворення перекисних радикалів, які вступають у взаємодію з різними клітинними компонентами: білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами та утворюють високотоксичні гідроперекиси і нові вільні радикали, призводить до швидкого руйнування клітинних структур та є основою патогенезу ХНН [167].

Окислення – важливий процес для життєдіяльності організму, однак за умов зростання його інтенсивності стає ушкоджуючим фактором для ліпідів плазматичних мембран - призводить до деполімеризації мембран та лізису клітин. Це пов'язано з надлишковим утворенням вільних радикалів та (або) порушення системи АОЗ. Проте відомо, що за умов уремії спостерігається зниження активності компонентів АОЗ у крові, можливо це пов'язано із самою процедурою ГД, однак не виключено вплив залишкової функції нирок, супутніх захворювань тощо [39, 40].

Концептуально, можна уявити чотири різних види окисдатовного стресу:

класичний тип, нітрозативний, карбонільний та хлорний [120]. У процесі вироблення кисневих радикалів основними його учасниками є мітохондрії і оксидази, включаючи NAD(P)H оксидазу, ксантиноксидазу, ліпооксигеназу, циклооксигеназу, ферменти цитохрома P450 і синтази оксида азота [223]. Джерелом супероксидних радикал-аніонів є дихальний ланцюг мітохондрій. При окисному фосфорилуванні за умов норми метаболізується 90% кисню. При хронічних захворюваннях нирок основними речовинами які відіграють роль в розвитку окисних пошкоджень є: дихальний ланцюг мітохондрій, NAD(P)H-оксидаза нейтрофілів, синтаза оксиду азоту (NOS), ксантиноксидаза, мієлопероксидаза [128].

Активні форми кисню продукуються наступними ферментами мітохондрій: NADH-убіхіноноксидоредуктазою, сукцинатдегідрогеназою, редуктазою цитохрому b_5 , моноамінооксидазою А і Б, дегідрогеназою дигідрооротату, дегідрогеназою α -гліцерофосфату, аконітазою, α -кетоглутарат дегідрогеназним комплексом [154].

Супероксидні радикал-аніони, які утворені внутрішньомітохондріально ініціюють розвиток процесів пошкодження в результаті вторинного продукування перекису водню, гідроксильних радикалів, пероксинітриду. Ферменти, які присутні всередині мітохондрій, чутливі до окисних пошкоджень, а порушення їх функціонування призводить до зниження синтезу АТФ, дисрегуляції транспорту кальцію, змінам проникності мітохондріальних транзиторних пор. Наслідком цих порушень є некроз або апоптоз клітин [128].

NAD(P)H-оксидаза належить до цитозольних ферментативних систем, що генерують супероксидні радикал-аніони. Вперше наявність NAD(P)H-оксидази було встановлено в нейтрофілах, де її основна роль полягає в забезпеченні захисту організму від дії патогенних факторів, що досягається шляхом продукування мілімолярних концентрацій O_2^- [128].

Крім фагоцитуючих клітин, NAD(P)H-оксидаза присутня і в клітинах нирки. Зокрема, в мезангіальних, проксимальнотубулярних клітинах, клітинах

гладеньких м'язів, ендотеліальних клітинах, фібробластах. Рівень продукції супероксидного радикал-аніона NAD(P)H-оксидазою в нефагоцитуючих клітинах значно нижчий, ніж в активованих нейтрофілах [128].

Супероксидні радикал-аніони, продуковані NAD(P)H-оксидазою нефагоцитуючих клітин, діють як вторинні месенджери в непатогенних редокс-сигнальних шляхах. Крім того, в нефагоцитарних клітинах можливе генерування активних радикалів кисню у високих кількостях, що викликає розвиток окисного стресу [132, 195].

Запобігає розвитку оксидативного стресу АОС. Роль її першої ланки (супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидази) спрямована на знешкодження та утилізацію активних радикалів кисню. Друга ланка АОС пов'язана з обміном одного з головних неферментативних антиоксидантів – глутатіону, його ферменти – глутатіонпероксидаза і глутатіонпредуктаза являються основними антиоксидантами. Третя ланка - система церулоплазмін-трансферин, яка регулює рівень іонів заліза, які є потужними ініціаторами вільнорадикального окиснення. Для стабільності мембранних систем клітин необхідна рівновага між ПОЛ та АОС [13, 48].

Одним з ключових не ферментних антиоксидантів є аскорбінова кислота, яка інгібує вільнорадикальні процеси і відіграє важливу роль у регуляції таких біологічних функцій, як ріст, розмноження та розвиток організму. Доведено роль аскорбінової кислоти у процесах кровотворення і синтезу гемоглобіну, колагену, нуклеїнових кислот, кортикостероїдів і статевих гормонів, імуної відповіді. Аскорбінова кислота сприяє перетворенню фолієвої кислоти в активні коферментні форми і відновленню окисленої форми токоферолу [68].

Вітамін С забезпечує антиоксидантний захист, підвищуючи активність ензимів глутатіонпероксидази та каталази. При цьому показано, що вітамін С активно нейтралізує такі кисневі радикали, як гідроксильний, супероксидний, пероксидний, гідроксипероксидний та нітратні. У високих дозах вітамін С може виявляти прооксидантну активність, тобто стимулювати вільнорадикальні

реакції *in vitro*, відновлюючи Fe^{3+} до Fe^{2+} [100].

Згідно даних літератури дефіцит вітаміну С у плазмі крові хворих на ХНН коливається у широких межах від 25% до 33% і після сеансу ГД його концентрація у плазмі крові зменшується до 50% [76, 100, 169]. У пацієнтів з ХНН знижений рівень у плазмі крові вітаміну С асоціюється з підвищенням ризику серцево-судинної патології та смертності [152, 170].

Після вживання вітаміну С хворими з ХНН його концентрація та ліпопротеїнів високої щільності у плазмі крові зростала з паралельним зниженням рівня сечової кислоти, ліпопротеїнів низької щільності, холестеролу та триглицеридів [117].

При хронічному захворюванні нирок важливим чинником, що пошкоджує мембранні структури ниркових каналців, є зростання процесів ПОЛ. Зміни фізіологічного рівня ПОЛ як в бік гальмування, так і активації для мембрани клітини є пошкоджуючим фактором. Кінцеві та проміжні продукти (вільні радикали, гідроперекиси жирних кислот, альдегіди, кетони) впливають на цитоплазматичну мембрану і можуть бути провідним фактором у патогенезі запальних захворювань нирок.

Розвиток запальної реакції викликає активацію лейкоцитів та продукцію кисневих радикалів лейкоцитами і резидентними клітинами. Утворені активні форми кисню ініціюють оксидативні процеси, пошкоджуючи при цьому клітини тканини нирки, що викликає деградацію молекул-мішеней з утворенням стабільних продуктів оксидативних процесів [223]. Оксидативний стрес є раннім проявом при ХНН та посилює розвиток захворювання [82, 137 169].

У раніше проведених дослідженнях було відзначено, що на фоні підвищення активності ПОЛ спостерігалось зниження активності АОС за рахунок зниження вмісту церулоплазміну і трансферину. Церулоплазмін є основним сироватковим антиоксидантом при цьому циркулюючи у крові, перехоплює надлишкові вільні радикали, пригнічуючи ПОЛ [98, 223].

«Золотим» стандартом у діагностиці ХНН вважається наявність характерного вогнищевого або дифузного зниження накопичення та розподілу РФП; класичною ознакою є наявність осередкових ділянок склерозу в нирках, так званих «рубців» [201]. Активація та проліферація клітин вважається основними процесами у формуванні ниркового фіброзу і це, на думку багатьох вчених, призводить до прогресування ниркової недостатності. Відбувається активація ниркових фібробластів, міграція епітеліальних клітин до інтерстицію, у вогнищі запалення підвищуються рівні цитокінів та хемокінів [201, 223]. Поширення різних типів клітин, в основному інтерстиціальних фібробластів і постійна запальна реакція призводять до накопичення компонентів екстрацелюлярного матриксу, головним чином колагену [167, 223].

У пацієнтів з ХНН які отримують ЗНТ методом гемодіалізу має місце окислювальний стрес та інсулінорезистентність. Високі рівні сечовини, що спостерігаються у пацієнтів з ХНН, посилюють оксидативний стрес. Одним із наслідків цього є порушення відповіді на дію інсуліну і транспорт глюкози. Ці зміни безпосередньо співвідносяться з підвищенням резистентності до інсуліну і збільшення вмісту адипокінів, асоційованих із інсулінорезистентністю як *in vitro*, так і *in vivo*. Резистентність до інсуліну є незалежним серцево-судиним ризик-фактором. Терапевтичні підходи, спрямовані безпосередньо на індуковані сечовиною вільні радикали кисню і резистентність до інсуліну, потенційно можуть допомогти знизити високу захворюваність і смертність, пов'язані з останніми стадіями ХНН [139, 153].

Висока токсичність продуктів ліпооксигенації поряд із зниженням активності антиоксидантного захисту на тлі мікроелементних порушень, призводить до руйнування цілісності клітинних мембран ниркових клітин, дезінтегрує відновні процеси [42].

Активація процесів ПОЛ у поєднанні з порушенням метаболізму NO є одним із механізмів пошкодження ниркової паренхіми при ХНН. Клінічні результати, отримані при обстеженні 84 хворих з ХНН, свідчать про зростання

рівня кінцевих продуктів ПОЛ і зниження активності АОС у крові, що найбільш виражено було у хворих з хронічним гломерулонефритом. При цьому порушення метаболізму NO у хворих з ХНН характеризувалось зниженням його продукції ендотеліальними клітинами та збільшенням системного синтезу NO. Комплексне лікування хворих з ХНН забезпечує значний нефропротекторний ефект і сприяє встановленню балансу в системах ПОЛ/АОС та обміну NO [50].

Оксидативний стрес у нирках і судинах тканин призводить до підвищення артеріального тиску через зміну біодоступності NO, який відіграє важливу роль у регуляції функції серцево-судинної системи. При оксидативному стресі кисневі радикали вступають в реакцію з NO та інактивують його внаслідок утворення пероксинітриду (ONOO⁻). Оксидативний стрес порушує продукцію NO шляхом зниження кофактора NO-синтази - тетрагідробіоптерина-4 та інгібує активність диметиларгінін диметиламіногідролази, яка розщеплює ендогенний ADMA, що є конкурентним інгібітором NOS [129].

Отже, нітрузо-оксидативний стрес у хворих з ХНН є провідним фактором виникнення та розвитку ендотеліальної дисфункції, ушкоджує паренхіму нирок та порушує їх функції, викликає зростання артеріального тиску та є чинником підвищеного ризику смертності.

1.4 Біохімічні зміни за умов нефропатії та цукровому діабеті 2-го типу

ХНН часто супроводжується ЦД 2-го типу та розвитком діабетичної нефропатії [21, 53, 63, 65, 66, 89]. За умов ЦД 2-го типу ключову роль у патогенезі діабетичних мікро- та макроангіопатій відіграє ендотеліальна дисфункція, основним проявом якої є порушення біодоступності NO внаслідок зниження його синтезу ендотеліальною NO-синтазою (eNOS) чи зменшення його пулу при взаємодії з супероксиданіоном з утворенням цитотоксичного пероксинітриду [70, 228].

Початкові стадії діабетичної нефропатії (ДН) асоціюють з підвищенням внутрішньониркової продукції NO за рахунок конститутивного синтезу ендотеліальної (eNOS) та нейрональної NO-синтази (nNOS), що зумовлює гіперфільтрацію та мікроальбумінурію. За умов прогресуючої нефропатії виявлено асоціацію між станом зростаючого дефіциту NO та виразною протеїнурією, погіршенням ниркових функцій, гіпертензією. На культурі гломерулярних ендотеліальних клітин людини показано, що підвищений рівень глюкози збільшує експресію eNOS, але знижує продукцію NO, що пов'язується із надлишком утворення супероксиду та дефіцитом L-аргініну. Інгібіторний ефект підвищеного рівня глюкози щодо синтезу NO попереджувався при додаванні в інкубаційне середовище супероксиддисмутази або L-аргініну (1 ммоль/л) [14, 35, 36, 149].

Цукровий діабет 2-го типу супроводжується розвитком оксидативно-нітративного стресу, важлива роль у механізмі ініціації якого належить NO і його стабільним метаболітам – NO_2^- та NO_3^- . При ЦД 2-го типу внаслідок активації прозапальними цитокінами (ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-6 та ін.) у багатьох типах клітин, зокрема в лейкоцитах та тромбоцитах, відбувається експресія гену індукцйбельної NO-синтази (iNOS) та надмірне утворення NO. Кінцеві продукти метаболізму NO посилюють цитотоксичну дію лейкоцитів периферичної крові, пошкоджують ендотелій [8]. Вміст вільного L-аргініну у тканинах і плазмі крові за цих умов знижується [16].

У хворих з артеріальною гіпертензією та ЦД 2-го типу ускладненим діабетичною нефропатією, спостерігається порушення метаболізму нітрогену оксиду, що характеризується зниженням вмісту нітриту та підвищенням суми нітриту і нітрату у крові, що зумовлено прискоренням перетворення NO у нітрат на фоні оксидативного стресу. Чинником зростання суми нітрит-нітрат є iNOS. Комплексне лікування цієї групи хворих інгібіторами ангіотензивперетворюючого ферменту та блокаторами рецепторів до ангіотензину 2 впливають на обмеження активності iNOS тим самим

покращують функціональний стан ендотелію судин [18, 58].

На ранній стадії діабетичній нефропатії спостерігається гіперфільтрація, наявність підвищення рівня генерування NO. Одночасно, тяжкі ступені протеїнурії, зниження швидкості клубочкової фільтрації, гіпертензії пов'язані з дефіцитом NO [184].

При ЦД 2-го типу за умови гіперглікемії, відбувається глікозилювання кальмодуліну, що є однією з причин зниження активності eNOS. Зменшення активності цього ферменту відбувається за рахунок розвитку гіпоксичного стану, який характерний для ЦД 2-го типу, оскільки утворення NO з L-аргініну за участю eNOS відбувається в присутності кисню [9, 57].

Значну роль при діабетичній нефропатії відіграє оксидативний стрес. Тривала гіперглікемія підвищує окислювальний стрес, змінює структуру та функції білків і ліпідів, викликає глікозилювання чисельних молекул та перекисне окислення ліпідів. При цьому також зростає частка поліолового шляху обміну глюкози. Підвищення внутрішньоклітинної продукції кисневих радикалів призводить до мікро- та макроушкоджень кровоносних судин. Слід відзначити те, що кисневі радикали модулюють сигнальні каскадні системи та сприяють зростанню продукції запальних цитокінів, а вони у свою чергу можуть стимулювати вироблення вільних радикалів [49, 224, 236].

Дія вітамінів С та Е за умов експериментальної діабетичної нефропатії мала виражений позитивний коригуючий ефект [38].

Не дивлячись на те, що діабетична нефропатія не відноситься до захворювань імунної системи, прозапальні цитокіни (TNF-alpha, ІЛ-1, ІЛ-6, ІЛ-18) і фактори, що активують фіброз (TGF-бета, MCP-1, CTGF, CAMs, AMCG), були залучені в її патогенез та активували запальні процеси та фіброз [7, 42, 119]. Діабетична нефропатія викликає зміни функціонального стану клітин крові [56].

Дослідженнями останніх 10-15 років доведено провідну роль активації ренін-ангіотензинової системи (РАС) у розвитку гіпертонічної хвороби та

судинних ускладнень при ЦД 2-го типу – діабетичної нефропатії, ретинопатії та ішемічної хвороби серця [6, 216]. В експериментальних та клінічних дослідженнях встановлено, що за умов ЦД 2-го типу під впливом гіперглікемії відбувається гіперактивація тканинної РАС із суттєвим підвищенням секреції ангіотензину II. АТ II сприяє розвитку фіброзу та склерозу тканини, в якій він локально синтезований - нирки, серце, судини сітківки або ендотелій судин, за рахунок активації комплексу цитокінів. Це обумовлює провідну роль препаратів, які блокують РАС, а саме: інгібіторів ангіотензинперетворюючого ферменту та блокаторів рецепторів до АТ II, у лікуванні судинних ускладнень при ЦД 2-го типу, зокрема у попередженні прогресування діабетичної патології нирок [41, 64].

Отже, на порушення функціонування нирок внаслідок дії різних етіологічних факторів та розвиток ХНН є важливою проблемою не тільки нефрології, але і медицини у цілому. Значна смертність хворих та великі затрати державних коштів та підтримання життя хворих з ХНН обумовлюють проведення багатогранних досліджень спрямованих як на профілактику, оцінку ролі різних етіологічних факторів та пошук нових підтримуючих терапевтичних заходів.

Серед нагальних завдань, що потребують досліджень у хворих з ХНН слід відзначити вивчення змін ключових показників ендотеліальної дисфункції, які включають параметри NO-синтазної системи та вміст гідроген сульфід. Потрібні поглиблені дослідження оцінки змін у плазмі крові до та після гемодіалізу у хворих на ХНН вмісту вазодилаторів та вазоконстрикторів, що є необхідним для проведення належної корекції лікування. При цьому слід враховувати те, що проведення сеансу гемодіалізу також має вплив на стан серцево-судинної системи та форменні елементи крові. У хворих з ХНН часто супутньою патологією є цукровий діабет, у зв'язку з чим актуальними є дослідження по виясненню особливостей перебігу нітрузо-оксидативних процесів за умов гіперглікемії, що дасть можливість продовжити життя хворих.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Клініко-лабораторна характеристика хворих з хронічною нирковою недостатністю

Обстеження проводились на базі нефрологічного відділення Львівської обласної клінічної лікарні та на базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща). Всього було обстежено 99 хворих, з них пацієнтів з ХНН на ґрунті гломерулонефриту – 42, з цукровим діабетом 2-го типу – 20. Обстежені пацієнти були поділені на групи. У першу групу було включено 42 хворих з ХНН V ступеня (гломерулонефрит), що отримували лікування замісної ниркової терапії методом гемодіалізу. У другу групу увійшли 20 пацієнтів, які мали цукровий діабет 2-го типу на тлі ХНН V ступеня. На базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща) було обстежено 37 хворих. Групу порівняння складала кров 20 донорів, середнім віком – 48 років.

Середній вік пацієнтів становив 56 років. Артеріальний тиск у хворих з ХНН становив: систолічний 170 мм рт. ст., діастолічний 85 мм рт. ст.

Діагноз ЦД 2 типу верифікували згідно положень Наказу МОЗ України № 1118 від 21.12.2012 р., критеріїв ВООЗ та Міжнародної асоціації з вивчення ЦД (IDF).

При проведенні клініко-діагностичних та лікувальних заходів враховували протоколи діагностики та лікування, що затверджені наказом МОЗ та НАМН України (№ 280/44 від 11.05.2011 р.) та рекомендації KDOQI та KDIGO з діагностики та лікування хворих на ХНН [47].

Обстеження хворих проведено на загальних етичних принципах, ухвалених Інтернаціональним конгресом з біоетики (Київ, 2000) та комісії з біоетики ЛНМУ імені Данила Галицького, протокол № 1 від 20 січня 2014 р.

Таблиця 2.1 – Основні клініко-лабораторні показники хворих з хронічною нирковою недостатністю IV-V ступеня (M±m)

Показник	Контроль n=20	До діалізу n=62
Вік, роки	43,1±7,13	54±10,2
Тривалість гемодіалізу (міс)	-	24 міс
Стать ч/ж	14/6	18/22
Паління	-	-
Систолічний АТ (мм рт.ст.)	126±3,28	168±10,5
Діастолічний АТ (мм рт.ст.)	76±4,53	79±6,2
Білірубін (мкмоль/л)	14,0±4,85	12,5±3,0
АсТ (од/л)	25,2±3,5	18,1±3,4
АлТ(од/л)	20,0±5,0	20,3±4,2

Кров для дослідження у кожного хворого забирали з фістульної голки перед та після гемодіалізу (ГД).

У плазмі крові визначали лабораторні показники (концентрацію креатиніну, сечовини, білірубіну, іонів Na⁺, K⁺ та Ca²⁺, активність АсТ, АлТ, вміст формених елементів крові, ШОЕ).

У хворих з ХНН, порівняно з групою донорів, концентрація креатиніну та сечовини зростала у 7,7 та 9,6 рази (p<0,01), що є свідченням розвитку уремії (табл. 2.2).

Після гемодіалізу концентрація креатиніну у плазмі крові зменшувалась на 41% (p<0,05), а сечовини – на 42% (p<0,05). Тобто, сеанс гемодіалізу призводить до зменшення рівня токсичних продуктів метаболізму у крові в середньому на 40%.

Уремія є ключовим фактором, що викликає розвиток хронічного запального процесу в організмі.

Таблиця 2.2 – Показники азотистого обміну у плазмі крові у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу (M±m)

Групи досліджених	Креатинин (ммоль/л)	Сечовина (ммоль/л)
Контроль	0,09±0,02	3,24±0,45
До діалізу	0,65±0,11**	28,9±5,0**
Після діалізу	0,36±0,09 [#]	16,0±4,4 [#]

Примітка. * - достовірність змін відносно групи донорів (p<0,05); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу.

У хворих з ХНН відзначаються виражені зміни у крові, що характеризується: зниженням кількості еритроцитів (на 29%, p<0,05) та гемоглобіну на 38% (p<0,05); знижується вміст лімфоцитів (на 38%, p<0,05) та відзначається тенденція до зменшення кількості моноцитів, швидкість ШОС при цьому зростала. Виявлені зміни формених елементів крові свідчать про зниження захисних механізмів та зростання (ШОЕ) (табл. 2.3).

Таблиця 2.3 – Вміст формених елементів у крові донорів та хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу (M±m)

Показники	Контроль	У крові хворих з ХНН
Еритроцити (10 ¹² /л)	3,64±0,22	2,58±0,22 *
Гемоглобін (г/л)	130,7±4,12	80,8±11,0 **
Кольоровий показник	1,04±0,05	0,76±0,05 *
Лейкоцити (10 ⁹ /л)	5±0,7	5,94±0,7
Еозинофіли (%)	1,9±0,7	1,19±0,6
Паличкоядерні (%)	5,18±1,0	6,69±1,4
Сегментоядерні (%)	72,1±4,1	71,75±3,2
Лімфоцити (%)	33±2,7	20,4±3,6 *
Моноцити (%)	7,82±1,0	6,5±1,4
ШОЕ (мм/год)	8,64±0,7	30±3,9 **

Примітка. * - (p<0,05), ** - (p<0,01) достовірність змін відносно групи донорів.

У хворих з ХНН нами не відзначено достовірних змін концентрації іонів Na^+ у порівнянні з групою донорів та при ГД. Концентрація іонів K^+ у хворих з ХНН до діалізу була на 31% ($p > 0,05$) вищою, після ГД – знижувалась до показників контрольної групи (табл. 2.4).

Таблиця 2.4 – Концентрація у плазмі крові іонів Na^+ , K^+ та Ca^{2+} у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу ($M \pm m$)

Групи досліджених	K^+ (ммоль/л)	Na^+ (ммоль/л)	Ca^{2+} (ммоль/л)
Контроль	4,56±0,31	138,5±2,19	1,28±0,039
До діалізу	5,97±0,58	136,8± 3,06	1,23±0,15
Після діалізу	4,7 ± 0,3	135,2 ± 1,34	0,84±0,12 [#]

Примітка. * - достовірність змін відносно групи донорів ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу.

Концентрація іонів кальцію у плазмі крові достовірно не відрізнялась між групою донорів та пацієнтами з ХНН до ГД, однак після сеансу гемодіалізу відзначено зниження концентрації кальцію на 32% ($p < 0,05$).

2.2 Характеристика пацієнтів обстежених на базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща)

На базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща) було обстежено 37 хворих віком 26-85 років (в середньому 67,2 роки) з нирковою недостатністю (табл. 2.5).

Серед обстежених було 17 жінок віком 59-85 років (в середньому 70 років) і 20 чоловіків віком 26-84 роки (в середньому 64,9 років). Дослідження проводились згідно вимог комісії з біоетики медичного університету у Любліні (№ протоколу KE-0254/91).

Таблиця 2.5 – Причини ниркової недостатності в групі обстежених пацієнтів

Причина ниркової недостатності	Кількість
Діабетична нефропатія	7
Гіпертонічна нефропатія	2
Гломерулонефрит	5
Інші: полікістоз нирок, запалення сечовивідних шляхів, амілоїдоз, ревматоїдний поліартрит, невідомі причини	23

Пацієнтів лікували гемодіалізом від 2 місяців до 6 років (в середньому 42 місяці), 3 рази на тиждень. Тривалість одного сеансу діалізу становила в середньому $4,6 \pm 0,2$ години. Пацієнтів лікували за методикою „*lowflux*” (19 хворих) та за методикою „*high-flux*” (18 хворих) із використанням діалізаторів із високим рівнем проникності (табл. 2.6).

Таблиця 2.6 – Характеристика показників проведеної гемодіалізотерапії

Показники гемодіалізу	M \pm m	Min-Max
Показники процедури:		
Тривалість сеансу діалізу, год	$4,6 \pm 0,2$	3,5-5
Потік крові в діалізаторі, мл/хв	$238,3 \pm 21,2$	200-300
Поверхня діалізатора, м ²	$1,32 \pm 0,2$	1,0-1,6
Об'єм ультрафільтрату, л	$2,7 \pm 0,9$	0,8-5,1
Параметри, що описують адекватність проведеного гемодіалізу:		
Kt/V	$1,6 \pm 0,16$	1,14-1,99
Об'єм розподілу сечовини, л	$35,1 \pm 5,91$	22,12-47,64
Величина ультрафільтрації, мл/год/кг	$5,97 \pm 3,67$	20,4-66,5
Коефіцієнт зменшення сечовини, %	$74,76 \pm 3,85$	27,0-88,7
K, мл/хв	$233,7 \pm 32,17$	136,91-290,51

Пацієнтів обстежували двічі: перед початком гемодіалізу і після його закінчення. Лабораторні дослідження включали визначення катехоламінів (норадреналіну, адреналіну і дофаміну) та вміст асиметричного та симетричного диметиларгініну у плазмі крові.

У контрольну групу увійшли 22 особи у віці від 20 до 54 років. Критеріями включення хворих у групу «здорових» обстежених були: нормальний показник маси тіла та результати рутинних лабораторних досліджень, а також відсутність запальних станів. Водночас на основі анамнезу було виключено наявність будь-яких захворювань, які могли істотно вплинути на активність адренергічної системи.

Кров для дослідження брали з венозної фістули після 15-хвилинного відпочинку пацієнта в положенні лежачи у вакуумні пробірки фірми SARSTED.

2.3 Методика виконання гемодіалізу

Гемодіаліз проводили за стандартною програмою (три рази на тиждень протягом 4 годин) з використанням синтетичних діалізаторів і бікарбонатного буферу.

На сьогоднішній день апарат “штучна нирка” випускають різні фірми, проте всі вони виконують функцію нирок:

- елімінація токсичних продуктів метаболізма;
- регуляція водно-електролітного балансу;
- регуляція осмотичної рівноваги рідини організму;
- регуляція кислотно-основного обміну.

Всі моделі “штучної нирки” включають:

- блок кровообігу або перфузійний блок;
- блок діалізата або рідинний блок;
- екстракорпоральну систему кровообігу;

- систему управління з контролем параметрів життєзабезпечення.

Блок кровообігу забезпечує переміщення крові по магістралям і діалізатору. При стандартному гемодіалізі швидкість кровообігу становить 250-300 мл/хв.

Блок діалізата забезпечує дві функції: змішування концентрації солей з водою в заданій пропорції, а також рух діалізуючого розчину по магістралям і діалізатору. Діалізуючий розчин із концентрата солей і хімічно чистої води безпосередньо готується в камерах апарату. Змінюючи градієнт змішування можна корегувати електролітний склад діалізуючого розчину. Змішування води і концентрату має важливе значення, оскільки його порушення веде до зниження або підвищення концентрації солей у діалізаті, що призводить до змін його дифузії через мембрану діалізатора.

Контакт крові з гіперосмолярним діалізатом (недостатньо розведений) призводить до підвищення концентрації іонів Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} в крові, а це у свою чергу викликає зростання артеріального тиску, а у подальшому до розвитку набряку-набухання головного мозку та загрози зупинки дихання. Гіпоосмолярний діалізат, призводить до втрати електролітів з крові, а це викликає зниження артеріального тиску, розвиток гемолізу, зростання ризику смерті.

Оскільки діалізуючий розчин представляє собою сольову рідину, тому вона має електропровідність-кондуктивність. Кондуктивність діалізуючого розчину пов'язана з вмістом іонів Na^+ . Чим вищим є концентрація Na^+ в розчині, тим вища його провідність. За умов норми концентрація Na^+ в коливається у діапазоні 130-145 ммоль/л.

Екстракорпоральний кровообіг складається з кровопровідних магістралей (артеріальної і венозної) і діалізатора. Кровопровідні магістралі – це система, в яку входить: насосний сегмент пов'язаний з артеріальними магістралями, повітряна камера на венозній частині, вставки для введення ліків та вимірювання деяких параметрів кровообігу.

Діалізатор апарату “штучна нирка” – це пристрій у якому відбуваються процеси очищення крові від токсинів через напівпрониклу мембрану і введення недостатніх компонентів для підтримки гомеостазу організму. У середині сучасних діалізаторів розташований пучок мікрОВОЛОКОН із синтетичного або напівсинтетичного матеріалу по яких проходить кров хворих. Омиваючи ці волокна діалізуючий розчин приймає поступаючі через їх стінки токсичні речовини і воду із крові, утворюючи таким чином процес дифузії і конвекції. Ефективність сеансу очищення залежить від: вида використаної напівпроникної мембрани, площі її активності поверхні, метода стерилізації діалізатора.

Розрізняють різні типи діалізних мембран: целюльозна-виготовлена із хлопка “Купрофан”; замітник целюлози - ацетат целюльоза, у яких вільні гідроксильні групи розташовані на поверхні целюлози; напівсинтетичні або целюльозосинтетичні мембрани - у них синтетичний матеріал змішується з рідкою целюльозою, що забезпечує закриття активних гідроксильних груп та підвищує біосумісність (“Гемофан”).

2.4 Біохімічні та лабораторні методи досліджень

Біохімічні методи досліджень включали визначення у плазмі крові до та після ГД та лізаті лімфоцитів показників системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа (активність NO-синтази, аргінази, вмісту нітрит-аніона, L-аргініну, асиметричного диметиларгініну та симетричного диметиларгініну, суми нітратів та нітритів), процесів перекисного окиснення ліпідів (вміст ТБК-активних продуктів, окиснених ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL)), показників системи антиоксидантного захисту (активності СОД, каталази, глутатіонпероксидази, вмісту вітаміну С), активність мієлопероксидази, вміст гідроген сульфїду та катехоламінів.

2.4.1 Методика отримання плазми крові та лізату лімфоцитів

У хворих плазму крові отримували в кількості 5 мл з фістульної голки перед та після гемодіалізу. Після чого кров у спеціальній пробірці розміщували у холодильник [90].

У крові хворих виділяли лейкоцити за стандартною методикою. Для цього до гепаринізованої крові додавали 10% желатину в об'ємному співвідношенні 9:1 та інкубували 15-30 хв. при 37°C. Після осідання еритроцитів проводили фракціонування лейкоцитів. Під час фракціонування клітин застосовували градієнт густини фіколу ("Pharmacia Fine Chemicals") і верографіну ("Srofa"). У пробірки вносили по 1,5 мл сумішей цих реагентів з питомою густиною 1,119 і 1,077 г/см³, які готували за допомогою ареометрів. Додавали 1 мл плазми, у якій містились лейкоцити, і центрифугували при 3 000 g впродовж 15 хв із застосуванням горизонтального ротора. Отримували дві фракції лейкоцитів. Фракція клітин, що розміщувалась на межі між плазмою і шаром з питомою густиною 1,077 г/см³ була збагачена лімфоцитами, фракція клітин на межі між шарами з питомою густиною 1,077 і 1,119 г/см³ – гранулоцитами.

Лізис тромбоцитів, присутніх у незначній кількості в 1-ій фракції, здійснювали 2-кратним об'ємом 0,02 % ЕДТА, гемоліз еритроцитів, присутніх у 2-ій фракції – 0,2 % NaCl. Клітини обох фракцій промивали фізрозчином, центрифугували при 3 000 g впродовж 5 хв і аналізували цитологічно. Цілісність і життєздатність клітин контролювали мікроскопічно і за допомогою реакції з 1% розчином трипанового синього.

2.4.2 Методика визначення активності NO-синтази у лізаті лімфоцитів

Визначення активності ізоензимів NO-синтази проводили за методикою В. В. Сумбаєва [59]. Активність NOS (КФ 1.14.13.39) визначали в реакційній суміші, що містила 2,5 мл 0,1 М трис-НСІ буфера, рН 7,4, у склад якого входив також CaCl₂ (10 мМ), 0,3 мл водного розчину L-аргініну (субстрат для NO-

синтази) в концентраціях 40, 80, 160 і 320 мкМ і 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН₂⁺. Реакцію запускали внесенням 0,1 мл лізату лімфоцитів 1:10 на трис-НСІ буфері.

Приготування контрольних проб здійснювали аналогічно до дослідних з тією різницею, що замість 0,1 мл 1 мМ розчину НАДФН₂⁺ вносили 0,1 мл бідистильованої води. Крім цього, досліджували безсубстратне окиснення НАДФН+Н⁻ в реакційній суміші, що містила 0,3 мл бідистильованої води замість 0,3 мл водного розчину L-аргініну.

Дослідні проби спектрофотометрували проти контрольних при $\lambda=340$ нм (максимум поглинання НАДФН₂⁺), інкубували 20 хвилин при +40° С, реакцію зупиняли внесенням до проби 0,02 мл 0,2 % водного розчину натрію азиду і реєстрували зниження екстинції при $\lambda=340$ нм. Активність NO-синтази виражали в нмоль НАДФН₂⁺, що окиснюється впродовж 1 хв.

Активність iNOS визначали в реакційній суміші, що містила 2,5 мл 0,1М трис-НСІ буфера, рН 7,4, 0,3 мл водного розчину аргініну і 0,1 мл 1 мМ водного розчину НАДФН+Н⁺, але в склад якої не входив СаСІ₂. Реакцію запускали внесенням 0,1 мл лізату лімфоцитів 1:10 на трис-НСІ буфері.

Активність cNOS визначали як різницю між сумарною активністю NO-синтази та активністю iNOS.

Отримані результати представляли у нмоль НАДФН/хв·мл.

2.4.3 Методика визначення активності аргінази

Дослідження активності аргінази (КФ 3.5.3.1) проводили за методом R. Davis [77]. Активність ензиму визначали за кількістю утвореної в реакції сечовини [131]. Дослідження проводили в два етапи. На першому етапі 0,1 мл досліджуваної плазми або лізату лімфоцитів доводили фізіологічним розчином до 0,5 мл, після чого додавали 0,1 мл буферу, що містить 0,1 М гліцину/NaOH, рН 9,5, 0,1 мл 10 мМ MnCl₂, 0,1 мл 0,25 М аргініну, потім інкубували при 37° С впродовж 30 хв. Реакцію зупиняли додаючи 0,1 мл 10% H₂SO₄.

На другому етапі проводили колориметричне визначення продукту реакції. Об'єм досліджуваної проби доводили дистильованою водою до 2 мл. Додавали 0,1 мл 4% ізонітрозопропіофенолу (на 95% етанолі). Кип'ятили 60 хв. Після чого проби охолоджували при кімнатній температурі, і через 15-20 хвилин вимірювали величину оптичної густини при $\lambda=540$ нм.

Активність ензиму виражали в мкмоль/хв·мл.

2.4.4 Методика визначення вмісту нітрит-аніона

Концентрацію нітрит-аніона (NO_2^-), кінцевого стабільного продукту метаболіту NO, визначали використовуючи відцентрифуговану при охолодженні кров (розведення 1:10) та реактив Грися [133].

Визначення проводили наступним чином: 0,2 мл дослідної проби вносили у центрифужну пробірку, додавали 0,2 мл 4% розчину їдкого натрію. Інкубували, перемішуючи на бані з льодом впродовж 10 хв. Після цього додавали 0,4 мл дистильованої води та 1,2 мл 4% розчину сірчанокислого цинку. Витримували на водяній бані з льодом впродовж 10 хв. Центрифугували впродовж 20 хв при температурі $+4^\circ\text{C}$ зі швидкістю 15000 об/хв.

До 1,4 мл відібраного супернатанту додавали 1,4 мл суміші (1:1) 0,1% N-нафтилетилендіаміну гідрохлориду та 1% сульфанілової кислоти, приготовленій на 5% ортофосфорній кислоті. Пробу з доданим реактивом поміщали на 15 хв у затемнене місце для розвитку забарвлення, вимірювали екстинцію за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі $\lambda = 550$ нм проти контролю. Контролем був 8% білковий розчин, оброблений за методикою досліджу.

Перерахунок здійснювали за калібрувальним графіком, одержаним стандартними розчинами із концентрацією NaNO_2 від 1 до 250 мкмоль/л.

Отримані результати представляли у мкмоль/л.

2.4.5 Методика визначення концентрації L-аргініну

Визначення концентрації L-аргініну у плазмі крові та лізаті лімфоцитів проводили за методом Т. Л. Алейнікової [4]. До 0,5 мл плазми або лізату лімфоцитів додавали 0,5 мл 5% трихлороцтової кислоти і центрифугували впродовж 10–15 хв при 3000 об/хв. Відбирали 0,5 мл надосадової рідини, додавали 1 мл 5% розчину NaOH, 0,05 мл 0,02% спиртового розчину α -нафтолу, 0,05 мл гіпобромідного реактиву, 0,2 мл 10% розчину сечовини і доводили дистильованою водою до 4 мл. Через 20 хв спектрофотометрували при довжині хвилі $\lambda=500$ нм. Проби і контроль спектрофотометрували проти води. Контроль містив ті ж реактиви, що й дослід, крім плазми крові.

В якості стандарту, для побудови калібрувального графіку для визначення концентрації L-аргініну, брали 5 мг солянокислого аргініну, який розчиняли в 100 мл води. Готували розведення, що містили від 5 до 40 мкг L-аргініну. Проводили визначення аналогічно дослід.

Результати представляли у мкг/мл.

2.4.6 Методика визначення асиметричного диметиларгініну та симетричного диметиларгініну

Визначення асиметричного диметиларгініну та симетричного диметиларгініну у плазмі крові проводили імуноферментним методом використовуючи набори фірми DLD Diagnostica GmbH (Німеччина).

Результати представлені у ммоль/л.

2.4.7 Методика визначення суми нітратів та нітритів

В основі методу лежить реакція утворення забарвленого комплексу з реактивом Грісса [34]. До 0,1 мл плазми додавали 0,5 мл води, осаджували білок шляхом внесення 0,3 мл 3 н розчину хлорної кислоти, центрифугували при 12000g. Відбирали 0,27 мл супернатанту, додавали 0,03 мл 3 М розчину аміаку, 0,06 мл 0,1 М розчину хлоридної кислоти, 0,6 мл 10% розчину оцтової

кислоти, близько 30 мг суміші (1:100) цинкового пилу та мангану сульфату (для відновлення нітрату до нітриту) або мангану сульфату (у випадку визначення нітрит-аніону), 0,54 мл реактиву Грісса. Всі реактиви готували на воді для ін'єкцій. Готову суміш ретельно струшували і центрифугували при 15000g, вимірювали екстинкцію супернатанту при довжині хвилі $\lambda=550$ нм. Контролем була дистильована вода. Концентрацію визначали за попередньо побудованим калібрувальним графіком і виражали у мкмоль/л.

2.4.8 Методика визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів визначали за методом Р. А. Тімірбулатова [61]. Проводили змішування 0,1 мл плазми крові або лізату лімфоцитів з 10 мМ фосфатним буфером у 125 мМ КСІ і доводили об'єм до 8 мл. Потім додавали 0,5 мл 1 мМ розчину KMnO_4 (кінцева концентрація 0,06 мМ). Після 10 хв інкубації вводили 0,5 мл 10 мМ розчину FeSO_4 і через 5 хв дослід припиняли. Температурний режим підтримували у межах 24°C .

Тест із тіобарбітуровою кислотою проводили за такою схемою: з інкубаційної суміші перед кожним внесенням KMnO_4 і FeSO_4 , а також в кінці досліду забирали проби об'ємом 0,5 мл. Для зупинки реакції ПОЛ у пробірці додавали 1 мл 20% розчину трихлороцтової кислоти і проводили реакцію з тіобарбітуровою кислотою – у пробу послідовно додавали 0,5 мл 1 н НСІ, 1 мл 0,7% розчину тіобарбітурової кислоти, отриману суміш витримували у водяній бані при 95°C впродовж 20 хв. Після охолодження суміш центрифугували 10 хв при 3000 об/хв. Оптичну щільність зафарбованої у червоний колір надосадової рідини визначали при довжині хвилі $\lambda=535$ нм на спектрофотометрі проти контрольної проби, що не містила біологічного матеріалу.

Отримані результати представляли у мкмоль/л.

2.4.9 Методика визначення активності СОД

Визначення активності СОД (КФ 1.15.1.11) у плазмі крові та лізаті лімфоцитів проводили за допомогою метода С. Чеварі [67]. До 0,1 мл плазми або лізата лімфоцитів, розведеного фізіологічним розчином, по черзі додавали 0,5 мл 96% абсолютного етилового спирту та 300 мг KH_2PO_4 , інтенсивно струшували впродовж 10 хв. Згодом проводили центрифугування при 5000 об/хв впродовж 30 хв. Після центрифугування відбирали 0,1 мл супернатанту (дослідна проба). В контрольну та дослідну проби вносили по 1,5 мл інкубаційної суміші (37 мг ЕДТА- Na , 330 мг нітротетразолію синього, 55 мг феназинметасульфату, розчинених у 300 мл 0,15 М фосфатного буферу (4,48 г Na_2HPO_4 , 0,25 г KH_2PO_4 , рН=7,8), і дистильовану воду – в контрольну пробу. До дослідної і контрольної проб для ініціювання реакції вносили 0,05 мл розчину НАДН. Проводили інкубацію у темряві впродовж 10 хв. Екстинкцію вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі $\lambda=540$ нм проти контролю.

Розрахунки проводили за формулою: активність ферменту визначали за відсотком інгібування утворення нітроформазау. Активність СОД вираховують за формулою $\text{СОД} (\%) = \frac{E_k - E_d}{E_k} \cdot 100\%$, де E_k та E_d – екстинкція контрольної та дослідної проб, відповідно.

Результати представляли у мкмоль НСТ/ хв·мг протеїну.

2.4.10 Методика визначення активності каталази

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) у плазмі крові або лізаті лімфоцитів визначали за методом М. Королюка [37, 45]. До 0,1 мл плазми або лізата лімфоцитів (на 1 мл трис- HCl - буфера, 0,05 М, рН 7,8) додавали 2 мл 0,03% розчину перекису водню. У контрольну пробу замість плазми або лізату лімфоцитів вносили 0,1 мл дистильованої води. Реакцію зупиняли через 10 хв, додавши 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі 410 нм проти контролю, у якій замість

перекису водню додавали 2 мл води. Активність каталази плазми крові або лізаті лімфоцитів розраховували за формулою:

$$E = (A_k - A_d) \times V \times t \times K$$

де: E – активність каталази (мкат/л),
 $A_k - A_d$ – екстинкція контрольної і дослідної проб,
 K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції перекису водню ($22,2 \times 10^3 \text{ мМ}^{-1} \times \text{см}^{-1}$),
 t – час інкубації (600 сек),
 V – об'єм проби (0,1 мл).

Результати представляли у мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{хв} \cdot \text{хг} \cdot \text{протеїну}$.

2.4.11 Методика визначення активності глутатіонпероксидази

Брали 100 мкл плазми крові або лізата лімфоцитів та інкубували з 830 мкл реактива (Трис-НСІ буфер 0,1М рН 8,5, що містив 6мМ ЕДТА і 12 мМ азиду Na. Безпосередньо перед дослідом на цьому буфері готували 4,8 мМ розчин GSH) на протязі 10 хв за 37°C, додали 70 мкл гідропероксид третбутил та інкубували 5 хв [46].

Реакцію зупиняли додаванням 200 мкл холодної ТХО, осаджені білки видаляли центрифугуванням. Набирали 100 мкл супернатанту і вносили до 10 мл реактиву (Трис-НСІ буфер 0,1М рН 8,5) і додавали 100 мкл реактиву Елмана. Через 5 хвилин проби спектрофотометрували при $\lambda = 412 \text{ нм}$ в 1 см кюветі проти контролю, що являє собою аналогічну пробу, але плазму крові в неї вносили безпосередньо перед осадженням білка.

Результати представляли у мкмоль/хв•мг протеїну.

2.4.12 Методика визначення активності мієлопероксидази

Активність мієлопероксидази у плазмі крові визначали на основі реакції з о-діанізидином за Bradley P. P. [91]. Для визначення активності мієлопероксидази у пробірку вносили 0,3 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 6,0),

0,3 мл 0,01 М розчину пероксиду водню та 0,5 мл 0,02 М розчину о-діанізидину. У суміш далі додавали 0,01 мл плазми або лізата лімфоцитів і відразу ж спектрофотометрували при довжині хвилі 460 нм проти дистильованої води. Через 10 хв вимірювання повторювали. Активність ферменту розраховували наступним чином: $A = (E2 - E1) / T / CB$, де: E2 – екстинкція через 10 хв; E1 – екстинкція після внесення плазми крові; T – час (10 хв); CB – концентрація білка (мг/мл).

Результати представляли в у.о.

2.4.13 Методика визначення вмісту окиснених ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL)

Визначення вмісту окиснених ліпопротеїнів низької щільності проводили використовуючи імуноферментний метод ELISA із застосуванням наборів реактивів фірми Merckodia AB (Швеція).

2.4.14 Методика визначення вмісту гідроген сульфід

Визначення гідроген сульфід у плазмі крові та лізаті лімфоцитів проводили за Dombkowski R. A. [110]. У пробірки дослідних проб добавляли до 0,5 мл 1% ацетату цинку, потім 2,0 мл води та 0,1 мл плазми крові. Далі вносили 0,5 мл n-фенілендіаміну та 0,4 мл FeCl₃. Ретельно перемішували та інкубували 5 хв. при кімнатній температурі. Після цього додавали 1,0 мл 20% ТХО, встрюшували та центрифугували 20 хвилин при 3000 об/хв.

Контрольну пробу готували подібно до дослідних, але замість плазми брали 0,03 мл води та 0,07 мл розчину альбуміну. Стандартну пробу готували як дослідну, але замість плазми брали такий самий об'єм розчину стандарту (10 мкг/мл). Екстинкцію дослідних, контрольних та стандартних проб вимірювали в кюветах товщиною 0,5 см проти води при $\lambda = 540$ нм.

Результати представляли у мкмоль/л.

2.4.15 Визначення концентрації вітаміну С у плазмі крові

Визначення віт С в плазмі крові проводили за методом Шпакова А.Е [69]. Напочатку в пробірку вносили 0,5 мл плазми, до неї додавали 5 мл 5% розчину метафосфорної кислоти (HPO_3) і центрифугували 5 хв при 1500–2000 об/хв. Надосадову рідину зливали і двічі осад промили 5–10 мл 5% розчину метафосфорної кислоти (HPO_3). Всі порції надосадових рідин об'єднали, доводячи об'єм до 25 мл. Контрольну пробу обробляли так само, як і дослідну. В дві пробірки відміряли по 1,5 мл екстракту. В одну з них додали по краплях 0,0001 Н розчин 2,6-дихлорфеноліндофенола до появи слабо-рожевого забарвлення, стійкого протягом 30 с (окиснена форма). В обидві пробірки додали по 0,5 мл 2% розчину 2,4-динітрофенілгідразину (реактив 3) і до 2,5 мл – дистильованої води. Дві проби обробляли, як для калібрувальної кривої – інкубували при 100°C упродовж 10 хв, охолоджували в льодяній воді. В кожную пробірку додавали невеликими порціями 2,5 мл 85% розчину сірчаної кислоти, охолоджували в льодяній бані після кожної порції. Через одну годину проби фотометрували при $\lambda = 520$ мкм.

Калібрування проводили готуючи стандартний розчин аскорбінової кислоти таким чином, що б її в пробірках містилось від 2 до 30 мкг; 5% розчином метафосфорної кислоти доводили об'єм до 1,5 мл. Для контролю брали 1,5 мл 5% розчину метафосфорної кислоти. По краплях додавали 0,001 н. розчин 2,6-дихлорфеноліндофенолу до появи слабо рожевого забарвлення, стійкого протягом 30 с. В усі пробірки додали по 0,5 мл розчину 2,4-динітрофенілгідразину, доводили об'єм до 20,5 мл бідистильованою водою та інкубували при 100°C упродовж 10 хв, охолоджували у льодяній бані. В кожную пробірку додавали невеликими порціями 2,5 мл 85% розчину сірчаної кислоти, охолоджуючи в льодяній бані після кожної порції. Через одну годину проби фотометрували при довжині хвилі 520 мкм.

Результати представляли у мкмоль/л.

2.4.16 Методика визначення вмісту катехоламінів

Для визначення вмісту катехоламінів проводили забір венозної крові в об'ємі 3,4 мл до пробірок з дикалієм едетатом (K_2EDTA -етиленодіамінотетраацетат). Для екстракції катехоламінів були використані набори фірми ChromSystem (Німеччина) з використанням оксиду алюмінію.

Для досліджень була використана хроматографічна система: помпа моделі 305 (GILSON Inc., USA); манометричний модуль моделі 805 (GILSON Inc., USA); електрохімічний детектор ED50 (DIONEX Corp. USA); розподільний клапан доз фірми Rheodyne модель 7125. Хроматографічний розподіл проведено на колоні C18 (150 x ,6 мм I.D.) (ChromSystem, Німеччина).

Визначення концентрації катехоламінів проводилось у плазмі крові, при цьому кров, взяту за стандартних умов, було відцентрифуговано при температурі 4°C при 3000 об/хв протягом 15 хв.

Зміни вмісту катехоламінів, викликані процедурою гемодіалізу, представлено у вигляді показника дельта (Δ). Цей показник розраховано на основі різниці концентрації катехоламінів, що визначалися до і після сеансу гемодіалізу ($\Delta = C_{\text{до}} - C_{\text{після}}$).

Результати представляли у пг/мл.

2.4.17 Методика визначення концентрації білка

Кількісне визначення концентрації білків проводили за допомогою метода O. Lowry [213], що об'єднує в собі реакцію на пептидні зв'язки і реакцію Фоліна на тирозин і триптофан.

Для цього досліджуваний розчин зразку, що містив 0,1 мл плазми, доводили дистильованою водою до 0,4 мл. Змішували із 2 мл реактиву, який готували наступним чином: до 50 мл 2% розчину карбонату натрію приготовленому на 0,1 М розчині NaOH додавали 1 мл 0,5% розчину $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ приготовленому на 1%-му розчині цитрату натрію, залишали при кімнатній температурі на 10 хвилин. Після чого додавали 0,2 мл реактиву

Фоліна-Чокальтеу, старанно перемішували і через 30–40 хвилин вимірювали величину оптичної густини при $\lambda=750$ нм на спектрофотометрі.

2.4.18 Лабораторні методи досліджень

Визначення у плазмі крові білірубину, АсТ, АлТ, креатиніну, сечовини, формених елементів крові, гемоглобіну, іонів Na^+ та K^+ , ШОЕ проводили загально прийнятими методами дослідження у клінічній лабораторії обласної клінічної лікарні.

2.4.19 Статистичні методи досліджень.

Для обробки отриманих показників використовували програми: пакет MS Office 2007 і статистичну програму Statistica для Windows версії 8.0 фірми StatSoft. Відповідність розподілу змінних величин з гіпотетичним розподілом нормальних величин перевірено з використанням тесту нормальності Шапіро-Вілка. Порівняльний аналіз для досліджуваних змінних проведено з використанням параметричних і непараметричних статистичних тестів. Для кількісних ознак безперевного характеру за умов нормального розподілу використовували параметричний тест t-Стюдента, порівнюючи результати обох груп. У випадках, що залишилися, для кількісних ознак використовували непараметричні тести, для порівняння пов'язаних величин застосовували U-критерій Манн-Уїтні для двох величин. Виявлену різницю вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
РОЛЬ СИСТЕМИ L-АРГІНІН / НІТРОГЕНУ ОКСИД / АРГІНАЗА,
ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ, АКТИВНОСТІ ЕНЗИМІВ
АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ, ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ
ТА КАТЕХОЛАМІНІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ХВОРИХ З ХРОНІЧНОЮ
НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ДО ТА ПІСЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ

Хронічна ниркова недостатність (ХНН) відноситься до широко розповсюджених патологій нирок, що має несприятливий прогноз та високу смертність хворих. Серед факторів ризику смерті хворих з ХНН значне місце займає розвиток серцево-судинної патології, яка у 59% випадків спричиняє смерть [94, 209, 233]. Серцево-судинна патологія включає як безпосередні зміни діяльності серця та нирок, ендотеліальну дисфункцію, зростання артеріального тиску, а також розвиток запалення – виникнення нітросо-оксидативного стресу, підвищення рівня прозапальних цитокінів [26, 114, 179, 194].

У хворих з ХНН, що знаходяться на підтримуючому гемодіалізі, відзначаються порушення функціонування системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа. Це пов'язано як із змінами вмісту амінокислоти L-аргініну у крові, яка є субстратом для NO-синтаз та аргінази, так і ендогенних похідних L-аргініну – АДМА та СДМА. Збільшений розпад ендогенних білків та поступлення у кров АДМА та СДМА, які впливають на активність NO-синтази, має суттєвий регуляторний вплив на стан судин та клініко-прогностичне значення перебігу захворювання.

Одну з ключових ролей у змінах функціонування ендотеліальної системи та формених елементів крові хворих на ХНН відіграє зростання оксидативних процесів та зміни у механізмах антиоксидантного захисту – ферментативної та неферментної ланок [2, 25]. Це стосується зміни активності СОД, каталази, глутатіонпероксидази та вмісту вітаміну С [136, 169]. Наскільки ефективно ензимні та неензимні компоненти системи антиоксидантного захисту

функціонують за умов регулярного ГД залежить ступінь розвитку оксидативного стресу.

Іншим важливим аспектом є визначення впливу самої процедури проведення гемодіалізу (ГД) на показники активності NO-синтаз, вміст нітрогену оксиду та його похідних, гідрогену сульфїду, а також оксидативних процесів, що на сьогоднішній день детально вивчається.

Розвиток ендотеліальної дисфункції, гіпертензії, підвищення вмісту у крові маркерів запалення та окисного стресу за умов ХНН викликає порушення функціонування симпатичного відділу вегетативної нервової системи [25, 130, 209].

Наскільки зміни катехоламінів спряжені з вмістом газових медіаторів (NO та H₂S) у хворих з ХНН потребує поглибленого вивчення.

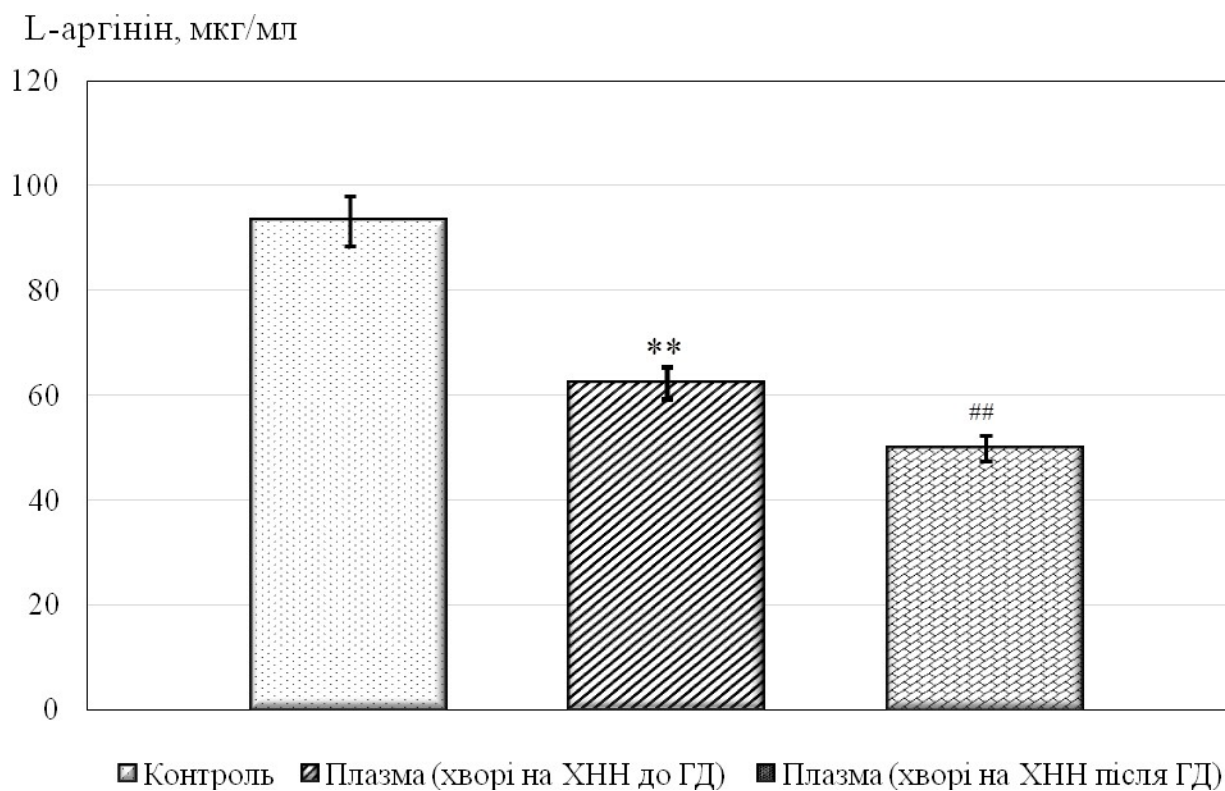
3.1 Зміни показників системи L-аргїнін / нітрогену оксид та вмісту гідрогену сульфїду у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Враховуючи роль системи L-аргїнін / нітрогену оксид та гідроген сульфїду у регуляції серцево-судинної системи та розвитку ендотеліальної дисфункції нами було проведено визначення вмісту L-аргїніну, АДМА та СДМА, нітрит аніону, суми нітратів та нітритів, гідроген сульфїду та активності аргїнази у плазмі крові донорів та хворих з ХНН до та після діалізу.

Амінокислота L-аргїнін відіграє важливу роль у функціонуванні NO-синтазної системи. Вона є прекурсором для синтезу NO, а також приймає участь у багатьох процесах організма [77]. Нашими дослідженнями показано, що концентрація L-аргїніну у крові донорів становила (93,3±19,0) мкг/мл, що відповідало показникам отриманим інших дослідників [173].

У хворих на ХНН до проведення гемодіалізу концентрація L-аргініну у плазмі крові була на 33% ($p < 0,01$) меншою, ніж у плазмі крові контрольної групи обстежених (рис. 3.1).

Зменшений вміст L-аргініну у крові хворих на ХНН може бути обумовлений як зниженням його поступлення з харчовим раціоном, так і зниженим рівнем його біосинтезу, а також змінами активності NO-синтази та аргінази.



Примітка. ** - достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,01$); ## - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,01$).

Рисунок 3.1 – Вміст у плазмі крові L-аргініну у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Після ГД концентрація L-аргініну у крові ще вираженіше зменшилась - на 20% ($p < 0,01$). Отже, у хворих на ХНН концентрація L-аргініну у плазмі крові є значно нижчою, ніж у плазмі крові донорів, сеанс ГД призводить до ще більш

значного зниження концентрації L-аргініну — на 47% ($p < 0,01$), порівняно з показниками у крові донорів.

Оцінюючи зміни вмісту у плазмі крові хворих на ХНН нітрит-аніону та суми нітритів та нітратів до ГД відзначено, що вміст NO_2^- мав тенденцію до зниження, тоді як сума нітратів та нітритів зросла у 2,2 рази ($p < 0,01$), порівняно з показниками крові донорів (табл. 3.1).

Таблиця 3.1 – Вміст у плазмі крові нітрит аніону та суми нітратів і нітритів у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Групи досліджених	Нітрит-аніон мкмоль/л	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ мкмоль/л
Контроль	0,83±0,07	3,21±0,58
Плазма (хворі на ХНН до ГД)	0,76±0,06	7,02±1,55**
Плазма (хворі на ХНН після ГД)	0,68±0,05*	5,31±2,16

Примітка. * - достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$); ** - $p < 0,01$.

Після ГД вміст NO_2^- знизився і у порівнянні з показниками крові донорів був на 18% ($p < 0,05$) нижчим; сума нітритів та нітратів знизилась на 25% ($p > 0,05$). Слід відзначити зміни співвідношення між NO_2^- та $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у плазмі крові контрольної групи та хворих на ХНН. Так, у крові донорів вміст NO_2^- становив 26% від суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, тоді як у хворих на ХНН - 11%, що свідчить про зниження вмісту вазодилататорного NO_2^- та зростання нітрозильованих молекул. Отримані результати свідчать як про низький рівень забезпечення хворих на ХНН L-аргініном, так і підвищення вмісту нітратів у крові.

Отже, гемодіаліз у хворих на ХНН викликає поглиблене зменшення вмісту у плазмі крові вмісту L-аргініну та NO_2^- , які регулюють тонус судин та функціональний стан ендотеліоцитів, у порівнянні з відповідними показниками до діалізу. Порівнюючи показники після гемодіалізу з даними групи донорів відзначено суттєве зниження вмісту NO_2^- та L-аргініну.

Важливе значення має оцінка вмісту АДМА та СДМА у плазмі крові хворих з ХНН, як маркера розвитку порушень серцево-судинної системи [81, 229].

Так, нами відзначено, що у плазмі хворих з ХНН до гемодіалізу концентрація АДМА була у 2,3 рази вищою ($p < 0,01$), а концентрація СДМА - у 3,4 рази ($p < 0,01$), ніж у крові донорів (рис. 3.2). Це свідчить про зростання розпаду цитоплазматичних білків, що містять у своєму складі L-аргінін.

Таблиця 3.2 – Вміст у плазмі крові асиметричного та симетричного диметиларгініну у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Групи досліджених	Асиметричний диметиларгінін (ммоль/л)	Симетричний диметиларгінін (ммоль/л)
Контроль	0,78±0,05	0,59±0,04
Плазма (хворі на ХНН до ГД)	1,82±0,06**	2,04±0,06**
Плазма (хворі на ХНН після ГД)	0,92±0,06 [#]	1,05±0,06 [#]

Примітка. * - достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$); ** - $p < 0,01$ # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

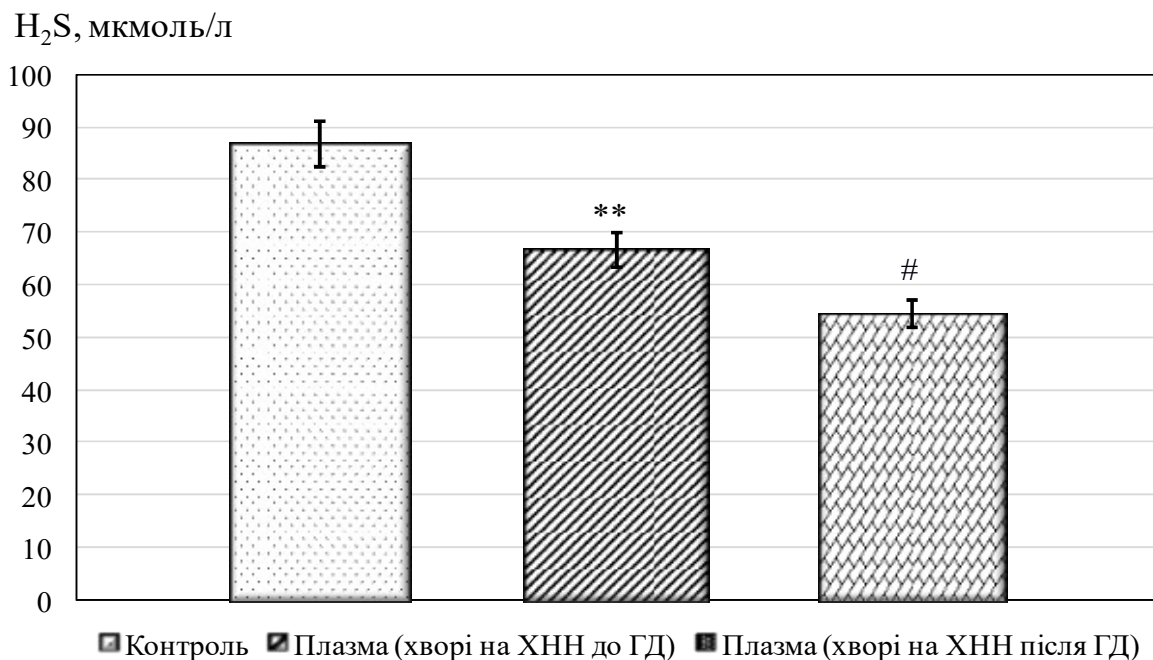
Після сеансу ГД концентрація як АДМА, так і СДМА знижувалась на 49% ($p < 0,05$), порівняно з відповідними показниками до ГД. Тобто, сеанс ГД призводить до зниження ендогенних похідних L-аргініну на однакову величину (49%).

Отже, у хворих з ХНН відзначається зростання рівня продуктів розпаду ендогенних білків, які вміщують L-аргінін. Слід відзначити, що стрес та зростання оксидативних процесів стимулюють продукцію АДМА у ендотеліальних клітинах [84]. Поступлення у загальній кровоплин АДМА

може викликати гальмування активності ізоформ NO-синтаз, посилювати адгезію моноцитів, активувати експресію прозапальних та хемотактичних факторів, зростанням вмісту оксимодифікованих ліпопротеїнів у макрофагах [168].

L-аргінін, що циркулює у крові також може метаболізуватись за участю аргінази. Рівень активності аргінази у хворих на ХНН порівняно з показниками контрольної групи підвищувався з $(0,24 \pm 0,06)$ мкмоль/хв·мг до $(0,32 \pm 0,06)$ мкмоль/хв·мг (на 33%, $p > 0,05$), що вказує на зростання рівня неокисного шляху обміну L-аргініну внаслідок чого утворюються орнітин та поліаміни.

Іншим важливим газовим медіатором, що впливає на тонус судин є H_2S . Серед його ефектів виділяють вазодилатуючий та антиоксидантний вплив. У наших дослідженнях концентрація H_2S у плазмі крові хворих з ХНН до ГД виражено зменшувалась - на 23% ($p < 0,05$) (рис. 3.2).



Примітка. ** - достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,01$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 3.2 – Зміни вмісту H_2S у плазмі крові хворих з ХНН до та після гемодіалізу.

Зниження вмісту H_2S у пацієнтів на ХНН є одним з факторів, що впливає на дисрегуляцію тону судин внаслідок чого відбувається зростання артеріального тиску.

Після ГМ концентрація H_2S у плазмі крові ще вираженіше знижувалась (на 12%, $p < 0,05$), у порівнянні з показниками контролю рівень зменшення H_2S становив 37% ($p < 0,01$).

Таким чином, отримані дані свідчать про розвиток вираженої ендотеліальної дисфункції у хворих на ХНН, яка супроводжується зниженням у плазмі крові вмісту вазодилаторів NO та H_2S . При цьому, якщо вміст циркулюючого крові після гемодіалізу нітрит-аніону зменшився на 18% ($p < 0,05$), то рівень H_2S знизився на 37% ($p < 0,01$), у порівнянні з контролем. Це вказує на синергічні зміни вмісту у крові ключових вазодилаторів NO та H_2S у хворих на ХНН, наслідком чого є зростання артеріального тиску.

Розглядаючи зміни вмісту вазомодуляторів (L-аргініну, NO_2^- , H_2S , АДМА та СДМА) після ГД у порівнянні з відповідними даними до ГД нами відзначено, що концентрація L-аргініну у плазмі крові зменшилась на 20% ($p < 0,05$), при цьому також спостергалась тенденція до зниження концентрації NO_2^- , вмісту суми нітратів та нітритів та концентрації H_2S (12%).

Після гемодіалізу концентрації АДМА та СДМА у плазмі крові хворих з ХНН зменшилась на 49% ($p < 0,05$) та 48% ($p < 0,05$), відповідно.

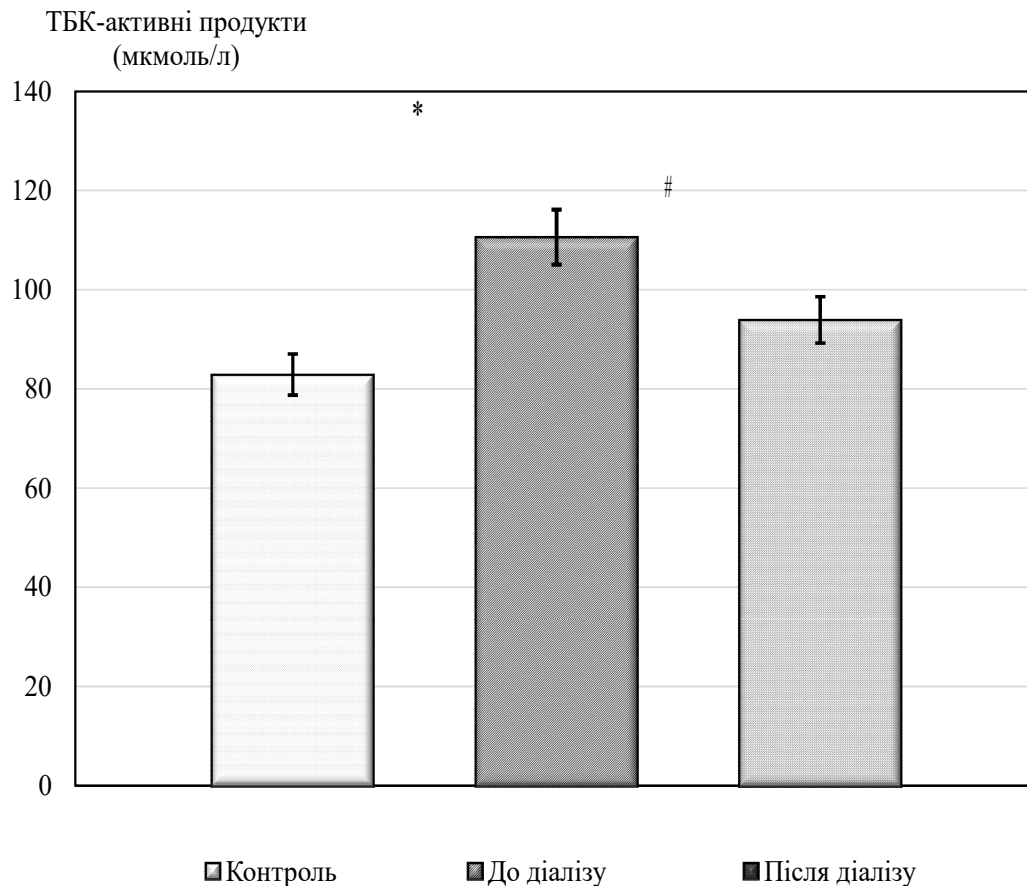
Отже, сеанс гемодіалізу у хворих на ХНН викликав зменшення вмісту у плазмі крові факторів, що регулюють тонус судин та функціональний стан ендотеліоцитів (L-аргініну, NO_2^- , H_2S), у порівнянні з відповідними показниками до діалізу, а також зменшувався вміст ендогенних аналогів аргініну, які можуть спричинювати негативний вплив на серцево-судинну систему.

3.2 Зміни оксидативних процесів, активності ензимів антиоксидантного захисту та вмісту вітаміну С у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

У організмі здорових людей, внаслідок перебігу метаболічних процесів, утворюється певна кількість продуктів ліпопероксидації, які потрапляють у кровоплин. Між продукцією радикалів, рівнем процесів ліпопероксидації та станом компонентів системи антиоксидантного захисту існує динамічна рівновага. Порушення цієї рівноваги внаслідок або зростання продукції радикалів, або зниження функціонування ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту призводить до виникнення оксидативного стресу. Синтезовані різними ензимами (NAD(P)H оксидазою, ксантиноксидазою, ліпооксигеназою, циклооксигеназою, ферментами цитохрома P450 і синтазою оксида азота) кисневі та інші види радикалів активують процеси перекисного окиснення ліпідів [167, 223].

Класичним показником змін процесів ліпопероксидації у клітинах та крові є вміст продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активні продукти). Зростання синтезу кисневих радикалів викликає окиснення ряду молекул, у тому числі і циркулюючих у плазмі крові ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL), рівень яких також свідчить про стан оксидативних процесів. До маркерів запалення також відносять зміну активності мієлопероксидази – ензима нейтрофілів, за участю якої синтезується гіпохлорит, який є сильним окиснювачем.

У плазмі крові донорів концентрація ТБК-активних продуктів становила $(82,9 \pm 4,8)$ мкмоль/л, вміст окиснених ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL) – $(1969 \pm 114,9)$ у.о., активність мієлопероксидази – $(4,5 \pm 2,0)$ ум.од. (рис. 3.3).



Примітка. * - достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 3.3 – Концентрація у плазмі крові ТБК активних продуктів у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу.

У плазмі хворих на ХНН до ГД відзначено зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 34% ($p < 0,05$), вміст oxLDL та активність мієлопероксидази – достовірно не змінювались. Між змінами ТБК-активних продуктів та L-аргініном до ГД відзначений обернений кореляційний зв'язок ($r = -0,39$, $p < 0,05$).

Після гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів зменшився на 14% ($p < 0,05$), активність мієлопероксидази поверталась до вихідних значень. Отже, сеанс гемодіалізу знижує вміст ТБК-активних продуктів та активність

мієлопероксидази, при цьому найбільш вираженими були зміни ТБК-активних продуктів.

У антиоксидантних механізмах значну роль відіграє ензиматична ланка – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза та глутатіонпероксидаза, а також не ферментативний компонент системи – вітамін С. СОД виступає як первинна ланка захисту проти дії супероксиданіону на молекули у мітохондріях, цитоплазмі та плазматичній мембран клітині, плазмі крові, тоді як каталаза розщеплює утворений СОД перекис водню.

У наших дослідженнях активність СОД та ГПО у плазмі крові у хворих з ХНН до гемодіалізу мала тенденцію до зростання, активність каталази – до зниження (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

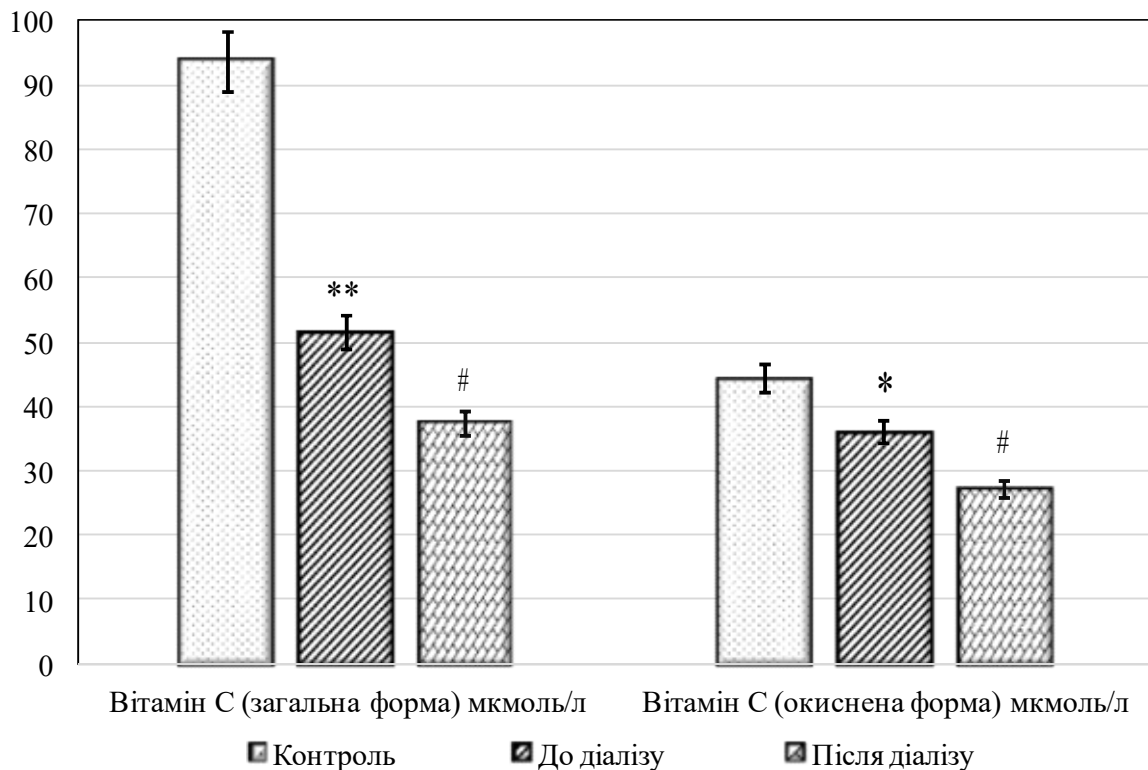
Групи досліджених	Контроль	До діалізу	Після діалізу
СОД (мкмоль НСТ/ хв•мг протеїна)	27,0±2,8	30,3±4,4	24,6±4,4
Каталаза (H ₂ O ₂ /хв•мг протеїна)	1,68±0,2	1,22±0,6	0,99±0,61*
Глутатіонпероксидаза (мкмоль/хв•мг протеїна)	43,7±7,49	53,66±9,04	43,54±11,95

Примітка. * - достовірність змін відносно показників групи донорів (p<0,05); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу.

Після ГД активність СОД та ГПО знижувались до показників групи контролю, а активність каталази ще більше знизилась і її активність була на 41% (p<0,05) нижчою, ніж у плазмі крові донорів.

Загальний вміст вітаміну С у плазмі крові групи донорів становив (93,6±15,9) мкмоль/л та його окисненої форми – (44,3±9,4) мкмоль/л. У плазмі хворих на ХНН до ГМ концентрація вітаміну С, як загальної його форми, так і

окисненої були нижчими на 45% ($p<0,05$) та на 19%, відповідно, у порівнянні з показниками групи донорів (рис. 3.4).



Примітка. * - достовірність змін відносно показників групи донорів ($p<0,05$); ** - $p<0,01$; # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p<0,05$).

Рисунок 3.4 – Вміст вітаміну С у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Таким чином, нами показано, що у хворих з ХНН, у порівнянні з показниками контролю, у першу чергу відзначалось зниження вмісту неферментативного компонента антиоксидантного захисту - вітаміну С, його загальної та окисненої форми. Також відзначений прямий кореляційний зв'язок між змінами вітаміну С та L-аргініном ($r=0,27$, $p<0,05$).

Після гемодіалізу концентрація вітаміну С достовірно знижувалась вміст загальної форми на 27% ($p<0,05$), окисненої форми – на 25% ($p<0,05$), у порівнянні з показниками до гемодіалізу.

Порівнюючи вміст вітаміна С після ГД з його концентрацію у плазмі крові групи донорів, то відзначаємо значне зниження його вмісту. Так, загальна форма вітаміну С була зменшена на 60% ($p < 0,01$), а окиснена форма - на 39% ($p < 0,01$). Вказані результати свідчать про виражений дефіцит вітаміна С у хворих з ХНН та значне його виведення з крові під час гемодіалізу.

Розглядаючи зміни компонентів системи антиоксидантного захисту слід відзначити, що після гемодіалізу активність СОД, каталази та глутатіонпероксидази мали тенденцію до зменшення, при цьому концентрація вітаміну С достовірно знижувалась ($p < 0,05$), у порівнянні з показниками до гемодіалізу. Звертає на себе увагу те, що сеанс гемодіалізу суттєво не впливав на активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту. Важливо відзначити, що концентрація вітаміну С знижувалась як у порівнянні з показниками контрольної групи, так і з показниками до гемодіалізу.

Враховуючи значні зміни вітаміну С під час гемодіалізу і менш виражені зміни ферментативної ланки антиоксидантної системи, він може розглядатись як індикатор стану антиоксидантної системи у хворих з ХНН. З іншої сторони виявлений значний дефіцит вітаміну С має бути компенсований хворим після гемодіалізу, що обумовлює його поступлення у організм з рідиною та їжею.

Таким чином, активність ензимів антиоксидантного захисту (СОД, каталази та глутатіонпероксидази) у плазмі хворих на ХНН до ГМ, порівнянні з показниками контрольної групи, змінювались недостовірно, тоді як концентрація вітаміну С, як загальної його форми, так і окисненої знижувались. Одноразовий сеанс гемодіалізу викликає зменшення рівня процесів ліпопероксидації, паралельно зменшувався вміст вітаміну С та відзначалась тенденція до зниження активності СОД, каталази та глутатіонпероксидази, у порівнянні з показниками до гемодіалізу.

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. У плазмі хворих на хронічну хворобу нирок на тлі уремії відзначається ендотеліальна дисфункція, що супроводжується зменшенням вмісту

вазодилататорів газових медаторів (нітрит-аніону та гідроген сульфїду), а також знижувався вміст вітаміну С та L-аргініну, при цьому зростали процеси пероксидного окиснення ліпідів та вміст ендogenousних похідних L-аргініну – асиметричного та симетричного диметиларгініну.

2. Після гемодіалізу, у порівнянні з показниками до діалізу, у плазмі крові на тлі зменшення рівня уремії ще вираженіше знижувались концентрації L-аргініну, нітрит-аніона, асиметричного та симетричного диметиларгініну, гідроген сульфїду, вітаміну С, вміст ТБК-активних продуктів та рівень активності аргінази, що свідчить про зменшення нітрузо-оксидативних процесів.

3. Різке зниження концентрації вітаміну С та L-аргініну після гемодіалізу у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю, свідчить про необхідність регулярного компенсаторного їх поступлення в організм з рідиною та їжею.

3.3 Вплив гемодіалізу на рівень катехоламінів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю

Серед чинників, що безпосередньо впливають на стан серцево-судинної системи у хворих з ХНН є рівень катехоламінів у крові. Підвищення активності симпатичного відділу вегетативної нервової системи спричинює зростання виділення катехоламінів у крові, що є одним з факторів підвищення артеріального тиску, ремоделювання артерій, зростання рівня периферійного опору судин та гіпертрофії лівого шлуночка [152, 212, 246]. Між впливом стресу та NO-синтазною системою на різних регуляторних рівнях існують тісні взаємозв'язки: у центральних нейронах (різних відділах ЦНС), периферійних клітинах та клітинах наднирників [214].

Однак, на сьогоднішній день, зміни рівня катехоламінів у крові хворих з ХНН дискутуються – відзначалось як зростання їх концентрації [209, 212, 246],

так і відсутність їх змін [113, 152]. Оцінка рівня катехоламінів є також важливою з точки зору змін регуляції тону судин враховуючи вміст газових медіаторів (NO, H₂S).

Нашими дослідженнями показано, що у хворих з ХНН, порівняно з показниками контрольної групи, у плазмі зростала концентрація норадреналіну у 2,3 рази ($p < 0,001$). Тоді як, концентрація адреналіну та дофаміну в плазмі хворих з ХНН статистично достовірно не відрізнялася від показників контрольної групи (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Концентрація катехоламінів у плазмі крові у групі донорів та хворих з ХНН

Катехоламіни (M±m, Min - Max)			
Плазма крові	Хворі на ХНН до ГД n=37	Група донорів n=22	Показник p
Норадреналін (пг/мл)	763,9±565,3 (71,2 – 2866,2)	240,5±42,5 (164,18 – 326,3)	p<0,001
Адреналін (пг/мл)	83,1±114,1 (13,10 – 689,87)	46,8±12,0 (31,9 – 69,45)	p>0,05
Дофамін (пг/мл)	44,03±23,9 (12,4 – 124,5)	40,5±8,9 (28,5 – 54,7)	p>0,05

Після сеансу ГД у плазмі крові хворих ХНН відзначено зниження концентрації норадреналіну на 24% ($p < 0,001$) по відношенню до його вмісту перед процедурою. Порівнюючи концентрації інших катехоламінів у плазми не виявлено достовірної різниці між їх показниками до і після гемодіалізу (табл. 3.6).

Аналіз даних з огляду на стать не виявив статистично достовірної різниці змін концентрації досліджуваних катехоламінів у жінок і чоловіків з ХНН порівняно з групою контролю.

Таблиця 3.6 – Концентрація катехоламінів у плазмі крові хворих на ХНН перед та після гемодіалізу

Катехоламіни (M±m, Min - Max)			
Плазма крові	Хворі на ХНН до ГД n=37	Хворі на ХНН після ГД n=37	Показник p
Норадреналін (пг/мл)	763,9±565,3 (71,2 – 2866,2)	552,8±597,6 (60,5 – 3657,4)	p<0,01
Адреналін (пг/мл)	83,1±114,1 (13,1 – 689,9)	60,7±73,7 (9,2 – 448,8)	p>0,05
Дофамін (пг/мл)	44,03±23,9 (12,4 – 124,5)	45,2±22,8 (10,64 – 95,5)	p>0,05

Підвищена активність симпатичного відділу вегетативної нервової системи, атеросклероз, цукровий діабет, анемія, гіпергомоцистеїнемія, запалення, гіпоальбумінемія є ключевими факторами порушень серцево-судинної системи та смертності хворих з ХНН [246].

Вважається, що концентрація норадреналіну є показником активності симпатичного відділу нервової системи [209]. Раніше було відзначено, що концентрація норадреналіну у плазмі крові хворих з термінальною стадією ХНН, що померли під час спостереження, була значно вище (3,97 нмоль/л, діапазон 1,76 до 7,06 нмоль/л), ніж у тих, що був живим (2,7 нмоль/л, діапазон від 1,68 до 4,63 нмоль/л). Також, у пацієнтів з ХНН які мали серцево-судинні ускладнення концентрація норадреналіну була вищою (3.99 нмоль/л, діапазон 1,88 до 6,69 нмоль/л), у порівнянні з тими, хто не мав ускладнень зі сторони серцево-судинної системи (2,70 нмоль/л, діапазон 1,66 до 4,63 нмоль/л) [212].

Однак, у інших дослідженнях було показано, що концентрація в плазмі норадреналіну та дофаміну хворих з ХНН, що отримували діалізтерапію, була значно підвищена. Проведення сеансу діалізу призводило до зниження концентрації в плазмі норадреналіна [118]. У наших дослідженнях було відзначено підвищений вміст норадреналіну, тоді як концентрації дофаміну та адреналіну статистично не змінювались.

Співставлення напрямку змін показників газових медіаторів (NO, H₂S) та норадреналіну у хворих з ХНН свідчить про чітку спрямованість домінування процесів, що викликають вазоконстрикцію та обумовлюють зростання артеріального тиску.

Отже, нашими дослідженнями показано, що серед досліджуваних катехоламінів зростає тільки концентрація норадреналіну у плазмі крові хворих з ХНН, що є одним з факторів ризику розвитку ускладнень серцево-судинної системи. Сеанс гемодіалізу призводить до зниження концентрації норадреналіну в плазмі крові.

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. Концентрація норадреналіну в плазмі хворих з термінальною стадією ниркової недостатності була у 2,3 рази ($p < 0,001$) вищою, ніж у обстежених контрольної групи, тоді як концентрація адреналіну та дофаміну статистично достовірно не відрізнялася від показників контрольної групи.

2. Не виявлено статистично достовірної різниці концентрації катехоламінів у жінок і чоловіків дослідної групи порівняно з контрольною.

3. Після сеансу гемодіалізу в хворих із термінальною стадією ниркової недостатності концентрації норадреналіну в плазмі знижувалась у порівнянні з його вмістом перед процедурою. Концентрації адреналіну та дофаміну плазми крові статистично достовірно не змінювались до і після гемодіалізу.

3.4 Зміни активності системи L-аргінін / нітрогену оксид /аргіназа, гідрогену сульфїду та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Цукровий діабет є частим ускладненням хворих з ХНН, що призводить до розвитку діабетичної нефропатії [53, 63, 66, 89]. Відомо, що як гіперглікемія, так і уремія викликають розвиток нітрозо-оксидативного стресу.

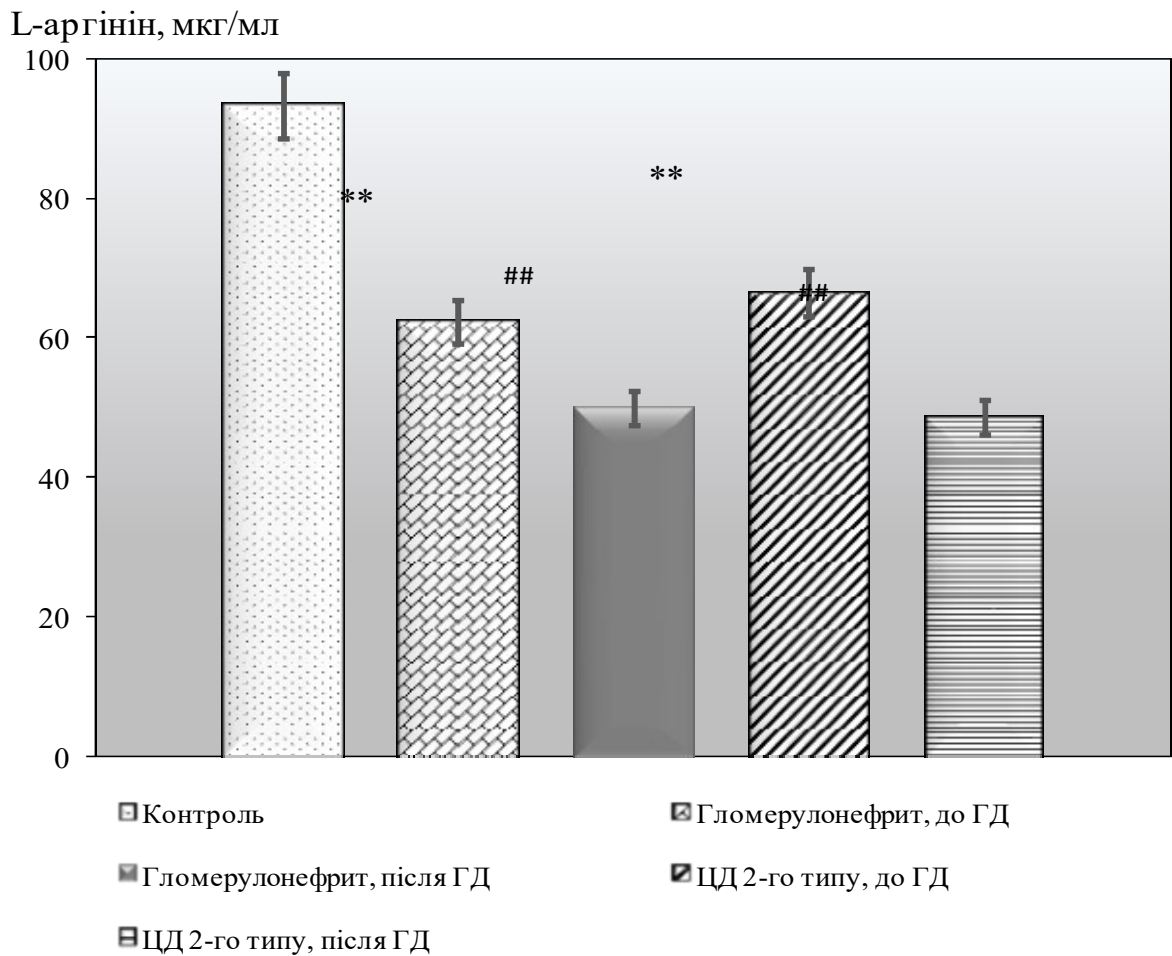
За умов ЦД 2-го типу ключову роль у патогенезі діабетичних мікро- та макроангіопатій відіграє ендотеліальна дисфункція у наслідок порушення біодоступності NO, що обумовлено зниженням його синтезу ендотеліальною eNOS чи зменшення його пулу внаслідок взаємодії з супероксид-аніоном та утворенням пероксинітриту [70, 228].

Згідно інших поглядів, одним з ефектів одночасної гіперглікемії та уремії є збільшення експресії eNOS ендотеліоцитами, при цьому продукція NO знижувалась, що пов'язують із надлишком утворення супероксиду та дефіцитом L-аргїніну [149].

Зростання рівня глюкози у крові на тлі уремії потребує глибшого вивчення функціонування системи L-аргїнін / нітрогену оксид /аргіназа.

Аналізуючи отримані нами результати можна відзначити наступне: вміст L-аргїніну у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД 2-го типу був на 29% ($p < 0,01$) нижчим, ніж у контрольної групи обстежених, що свідчить про зміни у системі регуляції обміну L-аргїніну за умов ХНН (рис. 3.5).

Після ГД концентрація L-аргїніну у хворих з ЦД 2-го типу зменшилась на 27% ($p < 0,01$), порівняно з рівнем до ГД. Порівнюючи з показниками групи донорів концентрація L-аргїніну у крові хворих з ЦД 2 типу була меншою на 48% ($p < 0,01$).



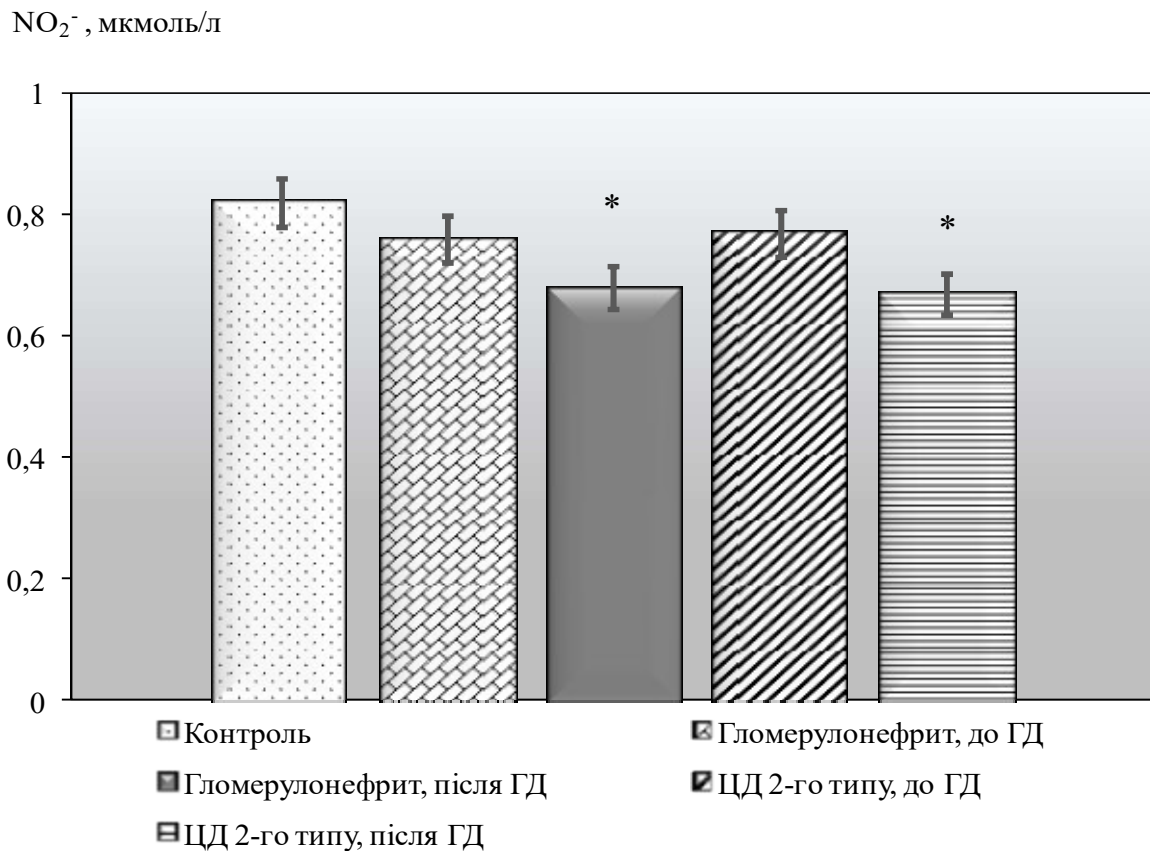
Примітка. ** – достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,01$); ## - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,01$).

Рисунок 3.5 – Вміст L-аргініну у плазмі крові хворих з ХНН з та без ЦД 2-го типу до та після гемодіалізу.

Слід відзначити, що рівень зниження L-аргініну у хворих з та без ЦД 2-го типу до та після ГД був майже тотожний. Це вказує на те, що гіперглікемія не викликає суттєвого впливу на вміст L-аргініну у плазмі крові у зв'язку з домінуванням патологічних процесів викликаних ХНН.

Концентрація NO_2^- у хворих з ЦД-2 типу до ГД була на рівні показників хворих з ХПП без ЦД 2 типу, після ГД – відзначена тенденція до подальшого

зниження вмісту NO_2^- . Порівнюючи отримані дані з результатами хворих ХПН без ЦД не відзначено достовірних змін (рис. 3.6).



Примітка. * – достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$).

Рисунок 3.6 – Вміст нітрит-аніона у плазмі крові хворих з ХНН з ЦД 2-го типу до та після гімодіалізу.

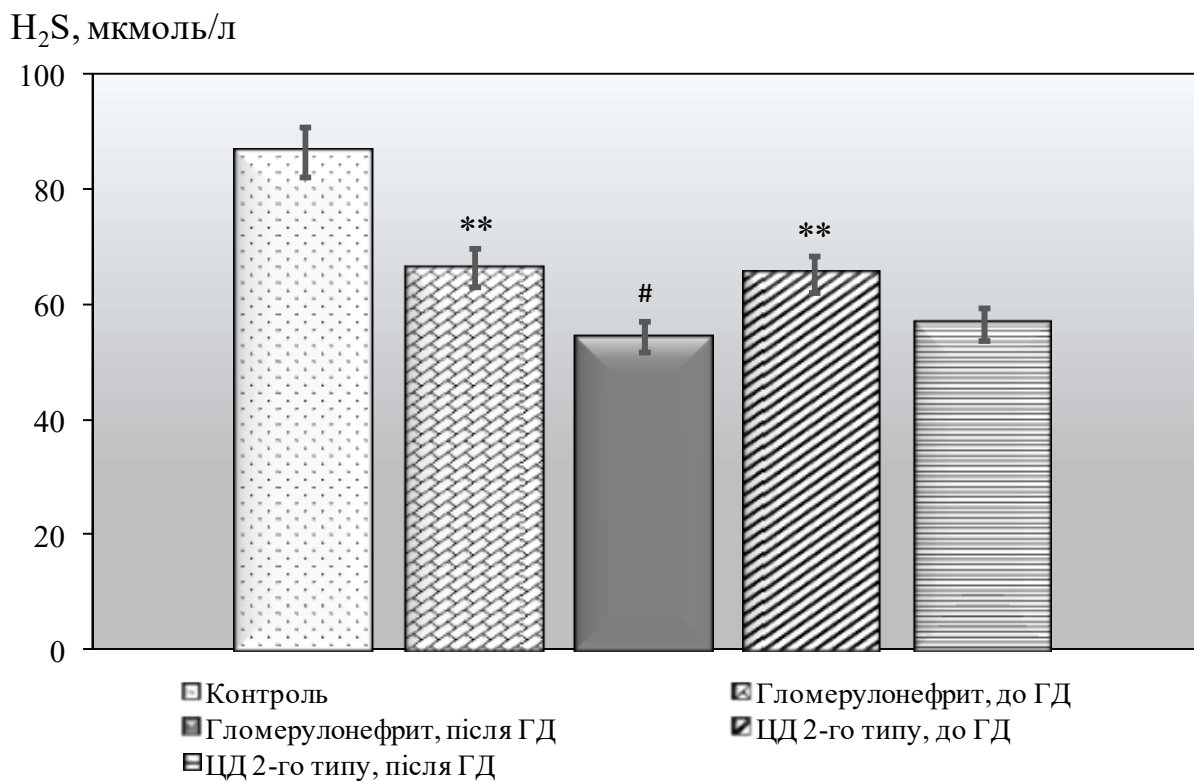
Слід відзначити, що сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ підвищувалась у меншій мірі (на 27%, $p > 0,05$), у порівнянні з відповідними показниками хворих ХНН без ЦД. Після ГД сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у хворих з ЦД-2 типу поверталась до показників групи донорів.

Таким чином, аналіз змін концентрації NO_2^- у плазмі крові хворих з ХНН з та без ЦД 2 типу свідчить про відсутність значного впливу гіперглікемії на його вміст у плазмі крові. При цьому відзначено зменшений рівень зростання

суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у хворих з ЦД 2 типу.

Вміст NO_2^- у сумі $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД до ГД – становило 19%, після ГД – 22%, що було вище, ніж у хворих на ХНН без ЦД і пов'язано з вищим рівнем суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у крові останніх.

Аналізуючи зміни H_2S у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД 2 типу відзначено, що вміст H_2S був меншим на 25% ($p < 0,05$), ніж у групи донорів і не відрізнявся від показників хворих з ХПП без ЦД (рис. 3.7).



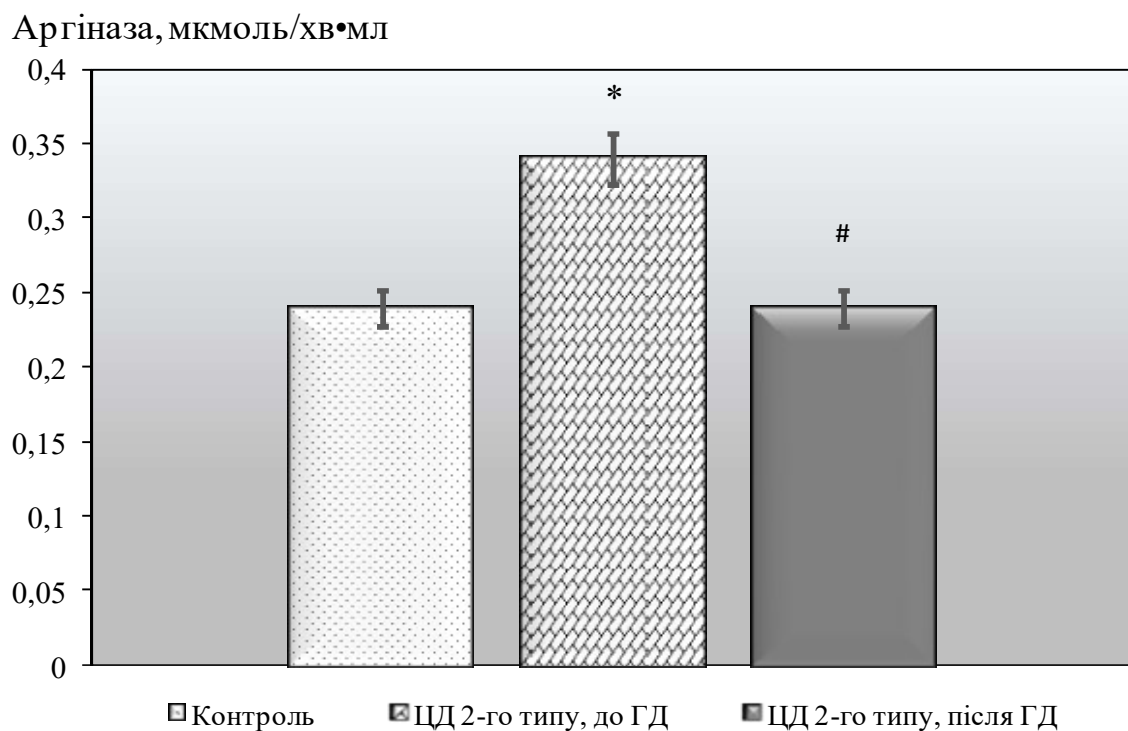
Примітка. ** – достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,01$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 3.7 – Зміни вмісту гідроген сульфиду у плазмі крові хворих з ХНН до та після гемодіалізу у хворих з ХНН з ЦД 2 типу.

Після ГД концентрація H_2S у плазмі крові зменшилась на 12% ($p > 0,05$), що не відрізнялось, від показників H_2S у плазмі крові у хворих на ХНН без ЦД.

Отримані результати свідчать, що гіперглікемія не викликала значного впливу на процеси продукції та вміст H_2S у плазмі крові хворих з ХНН з ЦД 2 типу як до, так і після гемодіалізу, порівняно з показниками хворих на ХНН без ЦД.

Активність аргінази у хворих з ХНН та ЦД 2-го типу зростала на 42% ($p < 0,05$) вище у порівнянні з показниками групи донорів. Після ГД відзначено зниження її активності до рівня показників групи донорів (рис. 3.8).



Примітка. * – достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 3.8 – Активність аргінази у плазмі крові хворих з ХНН до та після ГД у хворих з ХНН з ЦД 2 типу.

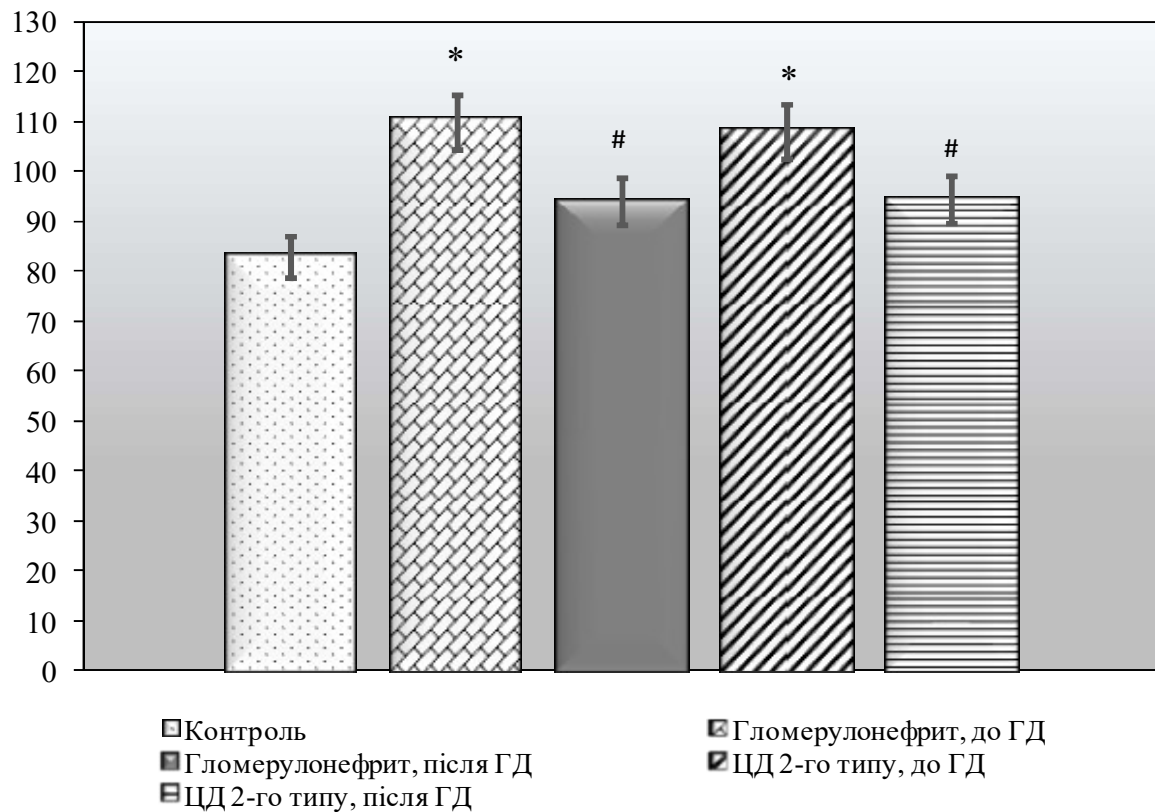
Отже, за умов наявності ЦД 2 типу у хворих з ХНН відзначалось підвищення рівня метаболізму L-аргініну неокисним шляхом. Зростання активності аргінази призводить до зниження концентрації L-аргініну у плазмі

крові хворих з ХНН з ЦД 2-го типу, що у свою чергу може лімітувати його транспорт у лімфоцити.

Отримані результати свідчать про те, що зниження продукції NO_2^- у хворих з ХНН з та без ЦД може бути обумовлено зростанням активності аргінази внаслідок чого відбувається переключення окисного метаболізму L-аргініну на неокисний шлях.

У хворих на ХНН з ЦД 2 типу вміст у плазмі крові ТБК-активних продуктів був вищим на 30% ($p < 0,05$), порівняно з групою донорів (рис. 3.9).

ТБК-активні продукти, мкмоль/л



Примітка. * – достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 3.9 – Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові хворих з ХНН та ЦД 2-го типу до та після гімодіалізу.

Після ГД відзначено зниження вмісту ТБК-активних продуктів на 13% ($p < 0,05$). Порівнюючи зміни вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД 2 типу з показниками хворих з ХНН без ЦД 2 типу, відзначаємо, що вони майже не відрізняються. Тобто, гіперглікемія не спричиняла суттєвого впливу на перебіг процесів ліпопероксидації у крові хворих на ХНН з ЦД 2 типу. Відзначений обернений кореляційний зв'язок між змінами ТБК-активних продуктів та L-аргініном у плазмі крові ($r = -0,59$, $p < 0,01$).

Активність СОД у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД 2 типу до ГД була менша (13%, $p > 0,05$), ніж у групи донорів. Після ГД зміни рівня активності СОД достовірно не відрізнялась від показників до ГД. Однак, порівнюючи напрям змін активності СОД у хворих на ХНН з та без ЦД відзначено знижений рівень її активності – на 23% у хворих на ХНН з ЦД. Це може бути пов'язано з глікозилюванням ензиму.

Рівень активність каталази у плазмі крові хворих з ХПП з ЦД 2 типу до ГД був на 54% ($p < 0,05$) меншим, ніж у групі донорів. Після ГД активність каталази мала напрям до подальшого зниження і у три рази ($p < 0,01$) була меншою, ніж у крові групи донорів. Порівнюючи зміни рівня активності каталази з даними хворих на ХНН без ЦД відзначено більш виражений рівень зниження її активності за умов гіперглікемії.

Отже, динаміка змін активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД та каталази) у плазмі крові до та після ГД свідчить про гальмуючий вплив гіперглікемії та їх активність, у більшій степені це визначено по відношенню до активності каталази.

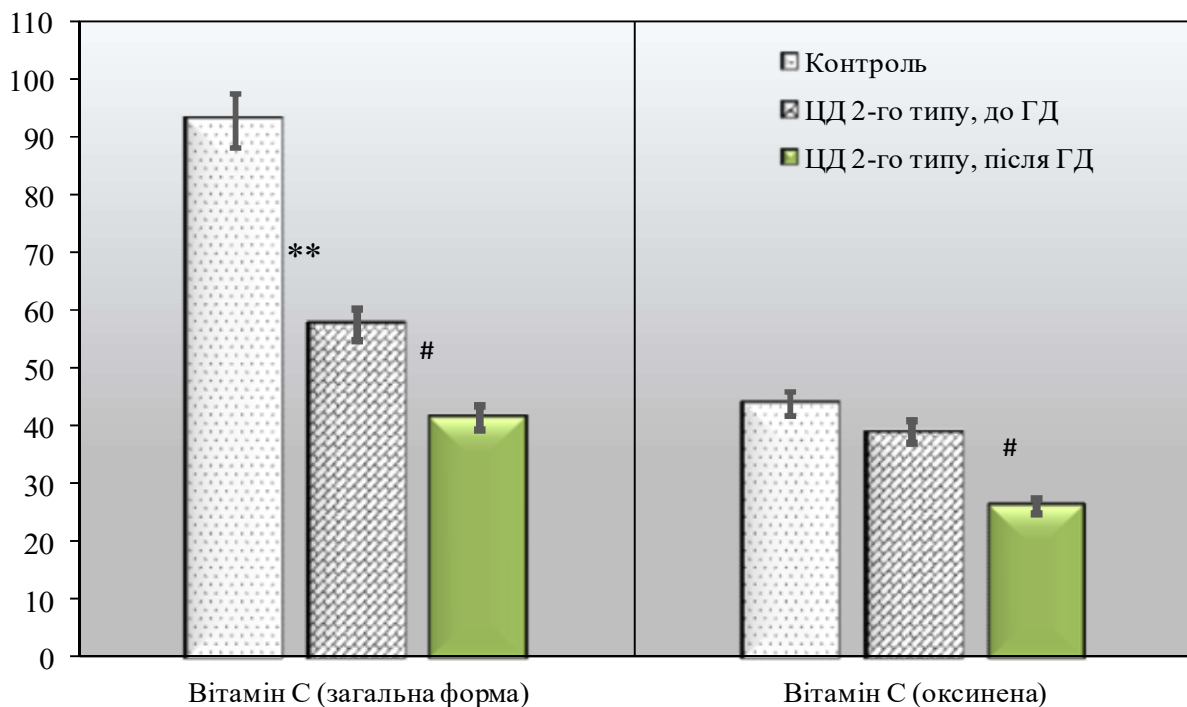
Таким чином, наявність ЦД у хворих на ХНН викликає зміни активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД та каталази), порівняно з показниками хворих без ЦД.

Відомо, що вітамін С забезпечує антиоксидантний захист за участю різних механізмів, у тому числі підвищуючи активність ензимів

глутатіонпероксидази, каталази. При цьому показано, що вітамін С активно нейтралізує такі кисневі радикали, як гідроксильний, супероксидний, пероксидний, гідроксипероксидний та нітратні [100].

Нашими дослідженнями показано, що загальний вміст вітаміну С у хворих ХПН з ЦД 2 типу був нижчим, ніж у крові групи донорів на 37% ($p < 0,01$) (рис. 3.10).

Вітамін С, мкмоль/л



Примітка. ** – достовірність змін відносно показників групи донорів ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 3.10 – Зміни концентрації вітаміну С у плазмі крові хворих з ХНН та ЦД 2-го типу до та після гемодіалізу.

Після ГД вміст загальної форми вітаміну С та його окисненої форми у крові знижувався ще на 29% ($p < 0,05$). Відзначений прямий кореляційний зв'язок між змінами вітаміну С та L-аргініном ($r = 0,71$, $p < 0,001$).

Порівнюючи результати змін концентрації вітаміну С у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД 2 типу та тез ЦД слід відзначити їх односпрямований напрям змін та відсутність впливу гіперглікемії на його зміни. Як хворі на ХНН з, так і без ЦД мають виражений дефіцит вітаміну С, при цьому процедура ГД призводила до його ще більшого зниження у плазмі крові.

Таким чином, зміни основних показників нітрато-оксидативних процесів та системи антиоксидантного захисту у хворих з ХНН з наявним ЦД 2-го типу були подібні до відповідних показників хворих з ХНН без ЦД.

Однак, при цьому нами виявлені наступні особливості серед досліджуваних показників у хворих з ХНН з наявним ЦД 2-го типу до гемодіалізу – відзначалось нижчий рівень активності каталази, напрям до зниження активності СОД, менший рівень зростання суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$

Після сеансу гемодіалізу у хворих з ХНН з наявним ЦД 2-го типу вміст L-аргініну, ТБК-активних продуктів, концентрація NO_2^- , активність аргінази у плазмі крові були на рівні показників хворих з ХНН без ЦД, тоді як сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ була на 42% меншою, у порівнянні з відповідними показниками хворих ХНН без ЦД. Зміни вмісту H_2S та вітаміну С до та після процедури ГД достовірно не відрізнялись від відповідних показників хворих з ХНН без ЦД.

Таким чином, гіперглікемія викликала моделюючий вплив на вміст нітритів та нітратів, активність аргінази та СОД у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД, порівняно з хворими на ХНН без ЦД.

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. У плазмі крові хворих з ХНН з наявним ЦД 2-го типу зміни показників нітрато-оксидативних процесів та системи антиоксидантного захисту (вміст L-аргініну, NO_2^- , H_2S , ТБК-активних продуктів та вітаміну С) були подібні до відповідних показників хворих з ХНН без цукрового діабету. При цьому, відзначено, у меншій мірі зростання суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, знижений рівень активності каталази та СОД.

2. Процедура гемодіалізу у хворих на ХНН з ЦД 2 типу не мала особливостей у напрямку змін досліджуваних показників нітрито-оксидативних процесі у порівнянні з показниками крові хворих з ХНН без ЦД.

3. Хворі на ХНН з та без ЦД потребують мають значний дефіцит вмісту L-аргініну та вітаміну С після сеансу ГД, порівняно з показниками групи донорів та їх рівнем до гемодіалізу, що обумовлює корекцію їх поступлення в організм.

Результати власних досліджень цього розділу опубліковані у наступних працях: [26, 27, 156].

РОЗДІЛ 4

**РОЛЬ СИСТЕМИ L-АРГІНІН / НІТРОГЕНУ ОКСИД /АРГІНАЗА
ТА ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ ЛІЗАТІ ЛІМФОЦИТІВ ХВОРИХ
З ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ
ДО ТА ПІСЛЯ ГЕМОДІАЛІЗУ**

4.1 Зміни активності системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, гідрогену сульфідру та оксидативних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

При розвитку хронічної ХНН відбуваються біохімічні зміни функцій клітин крові (лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів), що пов'язано з зростанням оксидативних процесів та дисрегуляцією функціонування системи NO-синтаза/аргіназа у клітинах крові [114, 208]. Відомо, що лімфоцити крові приймають участь у підтримці імунологічного статусу організму, синтезують про- та антизапальні цитокіни та NO, яке приймає участь у їх розвитку, диференціації та функціонуванні [87, 243].

У функціонуванні лімфоцитів значну роль відіграє система L-аргінін/нітрогену оксид/ NO-синтаза. Враховуючи те, що концентрація L-аргініну у плазмі крові є вищою, ніж у цитоплазмі лімфоцитів, одним з аспектів функціонування NO-синтази та продукції NO є поступлення L-аргініну у лімфоцит [215].

Показано, що за умов ГД відзначаються зміни активності NO-синтаз, вмісту нітрогену оксиду та процесів ліпопероксидації відбуваються також у формених елементах крові, зокрема у нейтрофілах та еритроцитах [3, 175].

На сьогоднішній день потребує глибшого вивчення зміни активності NO-синтази та аргінази, оцінка змін вмісту L-аргініну, газових медіаторів (NO та H₂S) та про-та антиоксидантних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН до та після ГД.

Згідно завдань були проведені дослідження по визначенню зміни активності NO-синтази, аргінази, вмісту L-аргініну, нітрит-аніону, суми нітратів та нітритів, гідрогену сульфіді, ТБК-активних продуктів, активності СОД, каталази та ГП у лімфоцитах крові хворих з ХНН до та після сеансу гемодіалізу.

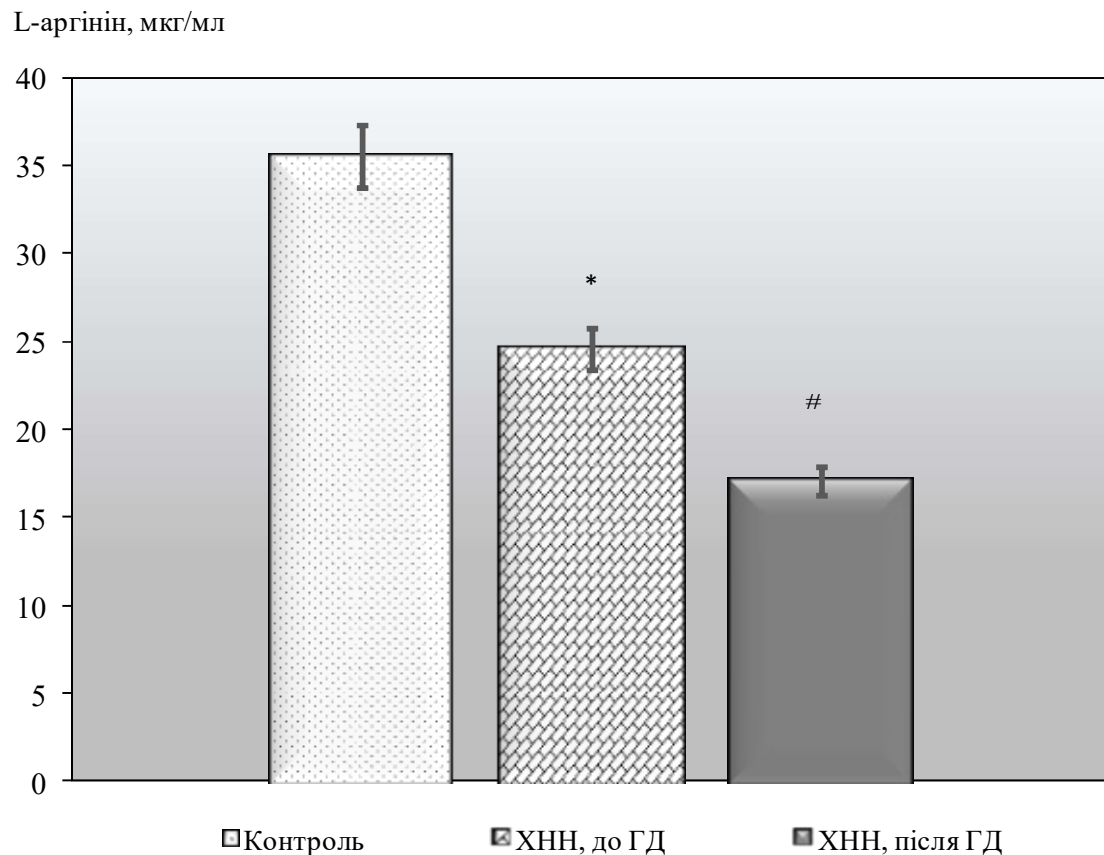
У лізаті лімфоцитів контрольної групи стан системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа характеризувався наступним: вміст L-аргініну становив $(35,45 \pm 6,61)$ мкг/мл, активність eNOS домінувала і була $(0,813 \pm 0,158)$ нмоль/хв·мл, тоді як активність iNOS була незначною $(0,064 \pm 0,018)$ нмоль/хв·мл, вміст нітрит-аніона становив $(0,7 \pm 0,05)$ мкмоль/л, сума нітратів та нітритів $(2,85 \pm 0,3)$ мкмоль/л, концентрація H_2S $(69,6 \pm 3,47)$ мкмоль/л. При цьому вміст ТБК-активних продуктів був низьким, активність СОД становила $(24,0 \pm 1,6)$ мкмоль НСТ/хв·мг білка, а активність каталази $(0,542 \pm 0,224)$ мкмоль H_2O_2 /хв·мл.

У лізаті лімфоцитів концентрація L-аргініну до ГД була нижчою на 31% ($p < 0,05$), у порівнянні з показниками групи донорів. При цьому вміст L-аргініну у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН був нижчим на 33% ($p < 0,05$), ніж у плазмі крові. Градієнт концентрації L-аргініну між плазмою крові та цитоплазмою лейкоцитів у хворих на ХНН становив $(37,7 \pm 6,3)$ мкг/мл, у контрольній групі $(57,8 \pm 5,7)$ мкг/мл. Тобто, дефіцит L-аргініну у хворих на ХНН становить біля 20 мкг/мл (рис. 4.1).

Після проведення сеансу ГД у лізаті лімфоцитів, у порівнянні з показниками до ГД, концентрація L-аргініну зменшувалась на 30% ($p < 0,05$), тоді як у плазмі крові – на 20%. Співвідношення між плазмою крові та лізатом лімфоцитів у хворих на ХНН після сеансу ГД становило $(32,8 \pm 4,2)$ мкг/мл. Тобто, сеанс ГД викликав значне зниження концентрації L-аргініну як у плазмі крові, так і лізаті лімфоцитів.

Оцінюючи зміни вмісту L-аргініну у хворих з ХНН після гемодіалізу та показниками групи донорів відзначено, що вміст L-аргініну у лізаті лімфоцитів

після ГД був на 52% ($p<0,05$) нижчим.



Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p<0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p<0,05$).

Рисунок 4.1 – Вміст у лізаті лімфоцитів L-аргініну у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу.

У лізаті лімфоцитів, у порівнянні з плазмою крові хворих на ХНН вміст нітрит-аніона був мав тенденцію до зниження, після сеансу ГД його вміст був на 21% ($p<0,05$) нижчим порівняно з показниками групи донорів (табл. 4.1).

Порівнюючи зміни нітрит-аніону у плазмі крові та лізаті лімфоцитів видно, що їх зміни були односпрямованими, при цьому у лізаті лімфоцитів рівень зниження нітрит-аніону був більшим. Це може бути обумовлено тим, що джерела нітрогену оксиду у плазмі крові та лімфоцитах є різними – нітроген оксид потрапляє у кров в основному з ендотеліоцитів, тоді як у цитоплазмі

лімфоцитів за участю NO – синтази продукується нітроген оксид, який приймає участь у регуляції внутрішньоклітинних процесів. Окрім цього, можлива зміна активності мембранних транспортних систем L-аргініну внаслідок ГД.

Таблиця 4.1 – Вміст у лізаті лімфоцитів нітрит аніону та суми нітритів та нітритів у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Групи досліджених	Нітрит-аніон мкмоль/л	NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ мкмоль/л
Контроль	0,7±0,05	2,85±0,3
Лімфоцити хворих на ХНН до ГД	0,61±0,05	3,34±1,39
Лімфоцити хворих на ХНН після ГД	0,48±0,04 [#]	2,45±0,57

Примітка. * - p<0,05 відносно контрольних значень; # - p<0,05 відносно показників до гемодіалізу.

Сума нітрати+нітрити у лімфоцитах хворих на ХНН до ГД мала тенденцію до зростання, порівняно з показниками групи донорів, однак було значно нижчою, ніж у плазмі крові – на 52% (p<0,05), що вказує на більший вміст нітрузо-вмісних продуктів у плазмі крові. Після сеансу ГД показник суми нітрати+нітрити знижувався до рівня показників групи донорів.

Значну роль у лімфоцитах відіграє рівень активності ізофом NO-синтази: у хворих з ХНН до ГД рівень активності iNOS був у 15 разів (p<0,01) вищим, рівень активності eNOS був нижчим на 70% (p<0,05), ніж у лімфоцитах групи донорів (табл. 4.2).

Активність аргінази у лімфоцитах, для якої субстратом також є L-аргінін, мала тенденцію до зменшення (на 14%, p>0,05), порівняно з показниками групи донорів.

Після сеансу ГД відбувалось різке зниження рівня активності iNOS (у 14 разів, p<0,01) та активності eNOS (у 8 разів, p<0,01), що свідчить про надзвичайну чутливість лімфоцитарної NO-синтази до процедури ГД.

Активність аргінази після сеансу ГД у хворих з ХНН зростала до вихідних показників.

Таблиця 4.2. – Зміни активності у лізаті лімфоцитів NO-синтази та аргінази у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Групи досліджених	iNOS нмоль/хв·мл	eNOS нмоль/хв·мл	Аргіназа мкмоль/хв·мл
Контроль	0,06±0,02	0,81±0,17	0,22±0,05
Лімфоцити хворих на ХНН до ГД	0,89±0,19**	0,24±0,08*	0,19±0,04
Лімфоцити хворих на ХНН після ГД	0,06±0,02 ^{###}	0,18±0,01 ^{###}	0,23±0,03

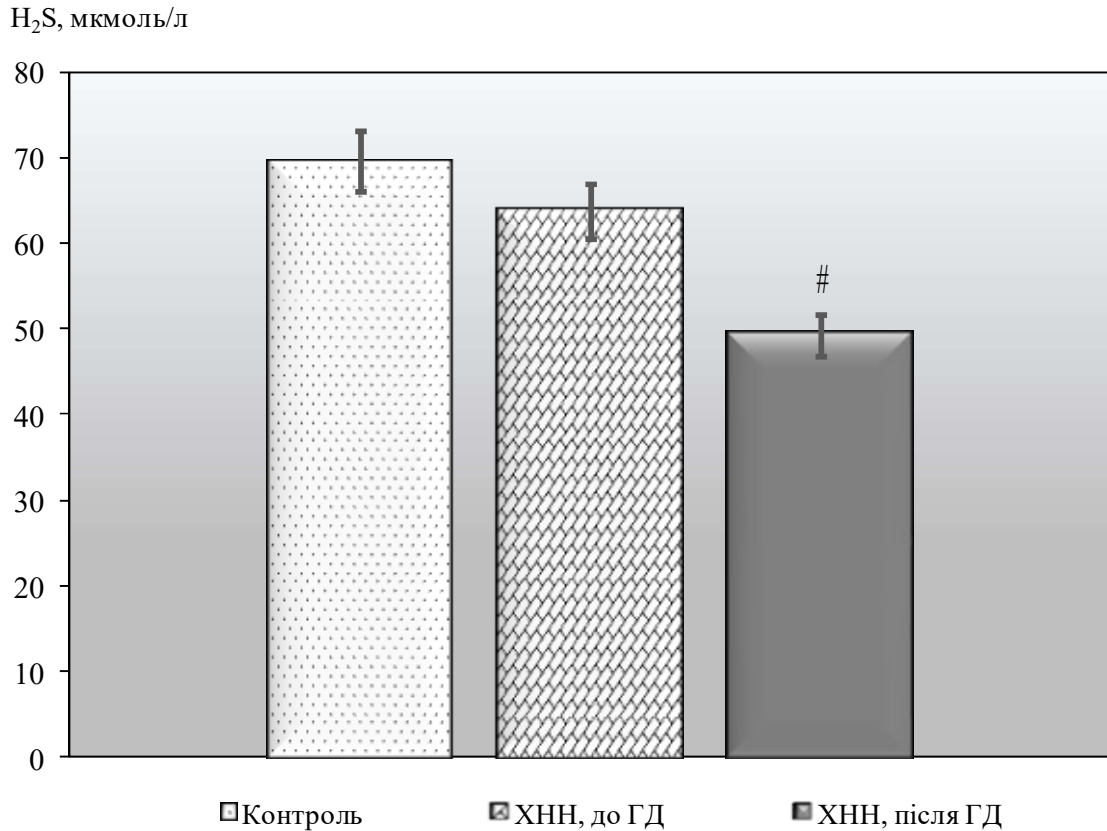
Примітка. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ відносно контрольних значень; # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ - відносно показників до гемодіалізу.

Таким чином, у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН відзначено значне зростання активності iNOS та зниження активності eNOS. Це викликає зменшення вмісту L-аргініну, однак зростання продукції NO не спостерігалось, що може бути пов'язано з його зв'язуванням з іншими молекулами.

Концентрація H_2S у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН до ГД суттєво не відрізнялась від показників групи донорів та його концентрації у плазмі крові. Після ГД вміст H_2S у лізаті лімфоцитів знижувався (на 23%) (рис. 4.2).

Порівнюючи вміст H_2S у лізаті лімфоцитів після ГД з показниками групи донорів відзначено різке його зниження – на 29% ($p < 0,05$).

Процеси ліпопероксидації у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН до ГД зростали - вміст ТБК-активних продуктів був підвищеним на 23% ($p < 0,05$). Після сеансу гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах зменшився на 22% ($p < 0,05$) (табл. 4.3). Відзначений обернений кореляційний зв'язок між змінами ТБК-активних продуктів та L-аргініном ($r = -0,34$, $p < 0,05$).



Примітка. # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 4.2 – Вміст у лізаті лімфоцитів гідроген сульфід у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Порівнюючи зміни вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів у хворих на ХНН, слід відзначити, що у плазмі крові рівень зростання ТБК-активних продуктів був вищим (33%, $p < 0,05$). При цьому слід враховувати, що у плазмі крові вміст ТБК-активних продуктів був у 3,4 рази вищим, ніж у лімфоцитах. Після ГД зниження вмісту ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів було більш вираженим.

Активність ензимів антиоксидантного захисту у лізаті лімфоцитів змінювалась наступним чином: активність СОД у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН до ГД, порівнюючи з показниками контрольної групи, була нижчою на 19% ($p < 0,05$), активність каталази на 44% ($p < 0,05$). Після ГД активність СОД та

каталази ще виваженіше знижувались - на 25% ($p < 0,05$,) та 65% ($p < 0,05$), відповідно. Активність ГП достовірно не змінювалась (табл. 4.4).

Таблиця 4.3 – Концентрація у лізаті лімфоцитів ТБК активних продуктів у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Групи досліджених	ТБК активні продукти, мкмоль/л
Контроль	26±2,2
Лімфоцити хворих на ХНН до ГД	31,9±3,2 *
Лімфоцити хворих на ХНН після ГД	24,8±3,3 [#]

Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$)

Таблиця 4.4 – Активність у лізаті лімфоцитів СОД, каталази та глутатіонпероксидази у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Групи досліджених	СОД мкмоль НСТ/ хв·мг протеїну	Каталаза мкмоль H_2O_2 / хв·мг протеїну	Глутатіон- пероксидаза мкмоль/ хв·мг протеїну
Контроль	24±1,6	0,542±0,224	43,71±7,494
Лімфоцити до ГД	19,5±1,4*	0,295±0,119*	43,68±13,28
Лімфоцити після ГД	18,1±1,5*	0,185±0,086*	42,96±10,08

Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p < 0,05$).

Порівнюючи активність СОД та каталази у плазмі крові до ГД з відповідними показниками лізата лімфоцитів відзначено більшу активність вказаних ензимів у плазмі крові ($p < 0,05$). Після ГД у порівнянні з показниками до ГД, активність СОД та активність ГП у лізаті лімфоцитів достовірно не змінювались, активність каталази мала тенденцію до зниження.

Таким чином, у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН відбуваються виражені зміни у системі L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та про- і антиоксидантних процесів, що проявлялось у зростанні активності NO-синтази та зниженні вмісту важливих регуляторних факторів - L-аргініну, нітрит-аніону та H_2S .

Зміни функціонування NO-синтазної системи є вкрай небезпечним для організму хворих на ХНН, враховуючи значну роль лімфоцитів як фактора імунологічного захисту організму.

Отже, сеанс гемодіалізу у пацієнтів з ХНН викликав зниження рівня нітрузо-оксидативного стресу у лізаті лімфоцитів.

Отримані результати дали змогу зробити наступні висновки:

1. У лізаті лімфоцитів хворих на ХНН до ГД порівняно з показниками групи донорів відзначено: зменшення вмісту L-аргініну ($p < 0,05$), активності eNOS ($p < 0,05$), СОД ($p < 0,05$) та каталази ($p < 0,05$) та зростання активності iNOS ($p < 0,01$) та вмісту ТБК-активних продуктів ($p < 0,05$).

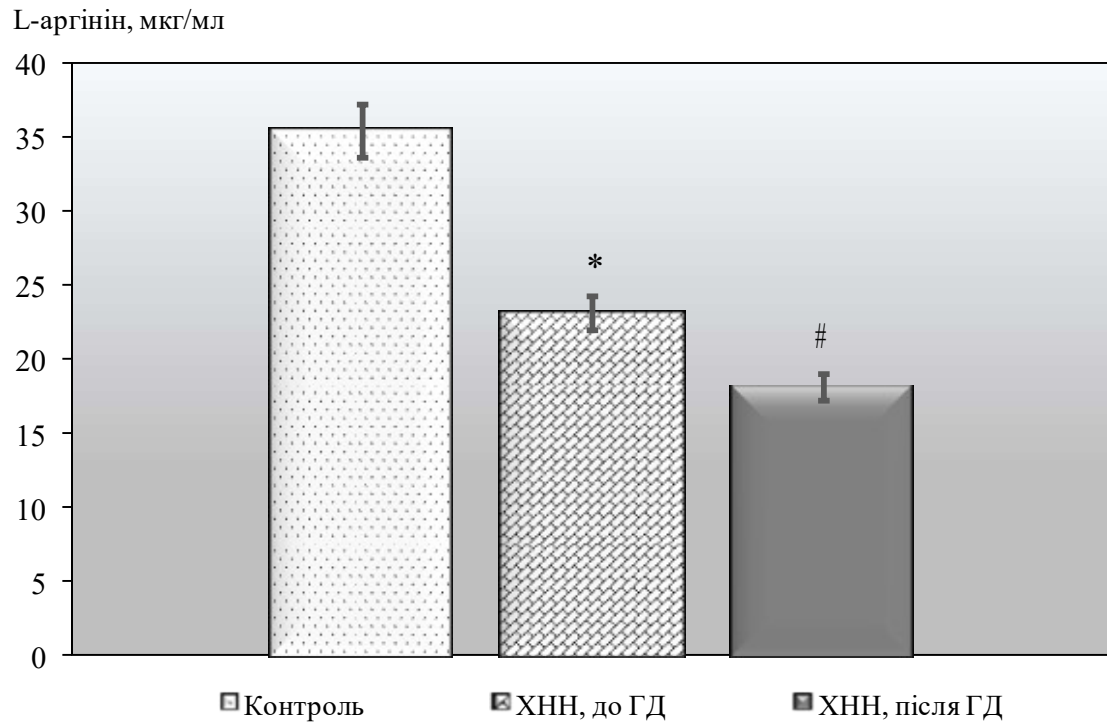
2. У лізаті лімфоцитів вміст L-аргініну (на 33%, $p < 0,05$), нітрит-аніона (на 20%, $p < 0,01$), сума нітритів та нітратів (на 100%, $p < 0,01$) були меншими, ніж у плазмі крові.

3. Сеанс гемодіалізу у хворих на ХНН спричиняв у лізаті лімфоцитів різке зниження активності iNOS ($p < 0,01$) та eNOS ($p < 0,05$), зменшення вмісту L-аргініну ($p < 0,05$), нітрит-аніону ($p < 0,05$), ТБК-активних продуктів ($p < 0,05$).

4.2 Зміни активності системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, гідрогену сульфідру та оксидативних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом до та після гемодіалізу

Важливим аспектом досліджень було визначення змін показників системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, гідрогену сульфідру та оксидативних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД до та після гемодіалізу.

Як видно з рис. 4.3 у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу до ГД концентрація L-аргініну була нижче на 35% ($p<0,05$), ніж у групі донорів.



Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p<0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p<0,05$).

Рисунок 4.3 – Вміст у лізаті лімфоцитів L-аргініну у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Після ГД вміст L-аргініну у лізаті лімфоцитів ще більш знижувався – на 22% ($p<0,05$). Порівняно з показниками групи донорів після ГД вміст L-аргініну був нижчим на 49% ($p<0,01$).

Вміст нітрит-аніона у лізаті лімфоцитів до ГД достовірно не відрізнявся від показників групи донорів. Після ГД його концентрація у лізаті лімфоцитів мала напрям до зниження і порівнюючи з показниками групи донорів його вміст був нижчим на 19% ($p<0,05$). Показники суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у лізаті

лімфоцитів до та після ГД достовірно змінювались у порівнянні з відповідними показниками групи донорів та хворих на ХНН без ЦД (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Вміст у лізаті лімфоцитів нітрит аніону, суми нітритів та нітритів у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

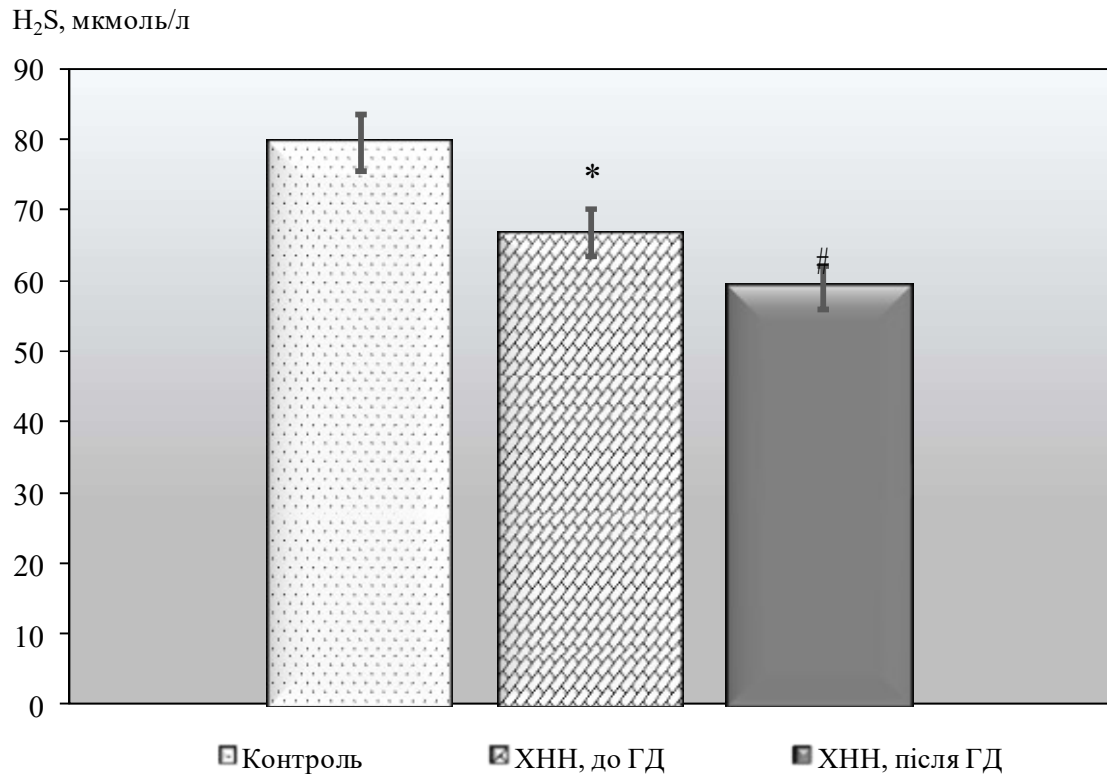
Групи досліджених	Нітрит-аніон, мкмоль/л	NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ мкмоль/л
Контроль	0,7±0,05	2,85±0,3
Лімфоцити хворих на ХНН та ЦД 2-го типу до ГД	0,64±0,04	3,4±0,57
Лімфоцити хворих на ХНН та ЦД 2-го типу після ГД	0,57±0,04 [#]	2,91±0,76

Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень (p<0,05); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу (p<0,05).

Концентрація H₂S у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД до ГД була на 16% нижче, порівняно з показниками групи донорів (рис. 4.4) і не відрізнялась від показників хворих на ХНН без ЦД. Після сеансу ГД вміст H₂S у лізаті лімфоцитів був нижчим за показники до ГД на 11%, однак порівняно з показниками групи донорів рівень H₂S у лізаті лімфоцитів знижувався на 26% (p<0,05).

Порівнюючи показники вмісту H₂S у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН з та без ЦД відзначено їх односпрямованість та подібність, що вказує на те, що гіперглікемія виражено не впливала на продукцію H₂S у лімфоцитах.

Слід відзначити, що роль синтезованого H₂S у імунокомпетентних клітинах на сьогодні детально вивчається. Одним з недостатньо досліджених питань є біологічне значення метаболітів утворених H₂S та NO.



Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Рисунок 4.4 – Вміст у лізаті лімфоцитів гідроген сульфід у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Рівень активності iNOS у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу до ГД був значно вищим ($p < 0,01$), порівняно з показниками контрольної групи і також переважав показники хворих на ХНН без ЦД у три рази ($p < 0,01$) (табл. 4.6).

Активність eNOS знижувалась на 20%, тоді як у хворих з ХНН без ЦД активність eNOS була менше на 64%, порівняно з показниками контрольної групи. Активність аргінази мала тенденцію до зниження. Після ГД рівень активності iNOS у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу зменшувався у 3,6 рази ($p < 0,01$), активність eNOS також знижувалась у два рази

у порівнянні з показниками до ГД. Активність аргінази мала спрямованість до зростання.

Таблиця 4.6 – Зміни активності у лізаті лімфоцитів NO-синтази та аргінази у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Групи досліджених	iNOS нмоль/хв·мл	eNOS нмоль/хв·мл	Аргіназа мкмоль/хв·мл
Контроль	0,06±0,02	0,81±0,17	0,22±0,05
Лімфоцити хворих на ХНН та ЦД 2-го типу до ГД	0,386±0,138**	0,65±0,34*	0,19±0,04
Лімфоцити хворих на ХНН та ЦД 2-го типу після ГД	0,108±0,07 ^{##}	0,23±0,06 ^{##}	0,2±0,03

Примітка. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ достовірність змін відносно контрольних значень; ## - $p < 0,01$ - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу.

Отже, нами відзначені особливості змін активності iNOS та eNOS у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу порівняно з відповідними показниками хворих на ХНН без ЦД, що проявлялось у більш вираженому зростанні iNOS, меншому рівні зниження eNOS до ГД і, відповідно, вищим рівням активності iNOS та eNOS після ГД.

Вважається, що підвищення рівня активності iNOS викликає різке зростання продукції NO, який вступає у реакцію з супероксидними радикалами у результаті чого утворюється токсична сполука периксинітрит [128]. За умов різкої активації iNOS знижується рівень активності аргінази, що пов'язано з їх конкуренцією за L-аргінін.

Вміст ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН та з ЦД 2-го типу до гемодіалізу був на 12% вище, порівняно з показниками контрольної групи і не відрізнявся від показників хворих на ХНН без ЦД (рис.

4.5). Відзначений обернений кореляційний зв'язок між змінами ТБК-активних продуктів та L-аргініном ($r=-0,38$, $p<0,05$).

ТБК-активні продукти, мкмоль/л

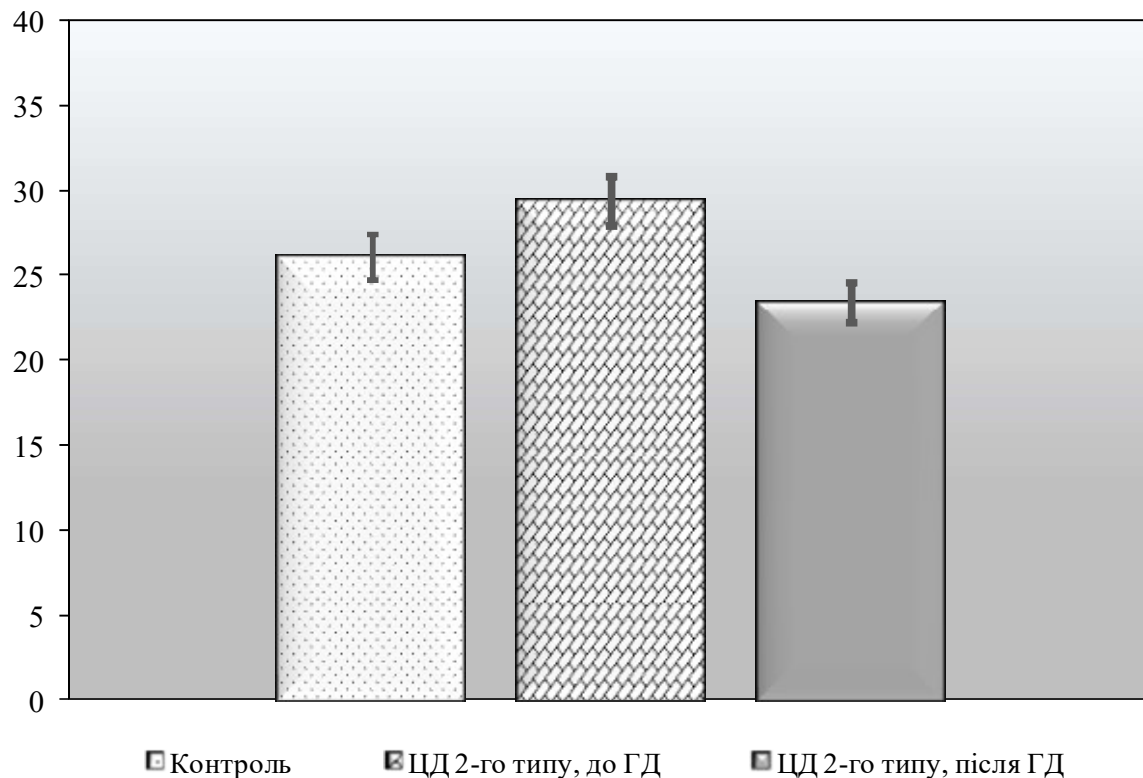


Рисунок 4.5 – Вміст ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Після ГД вміст ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів повертався до вихідних значень.

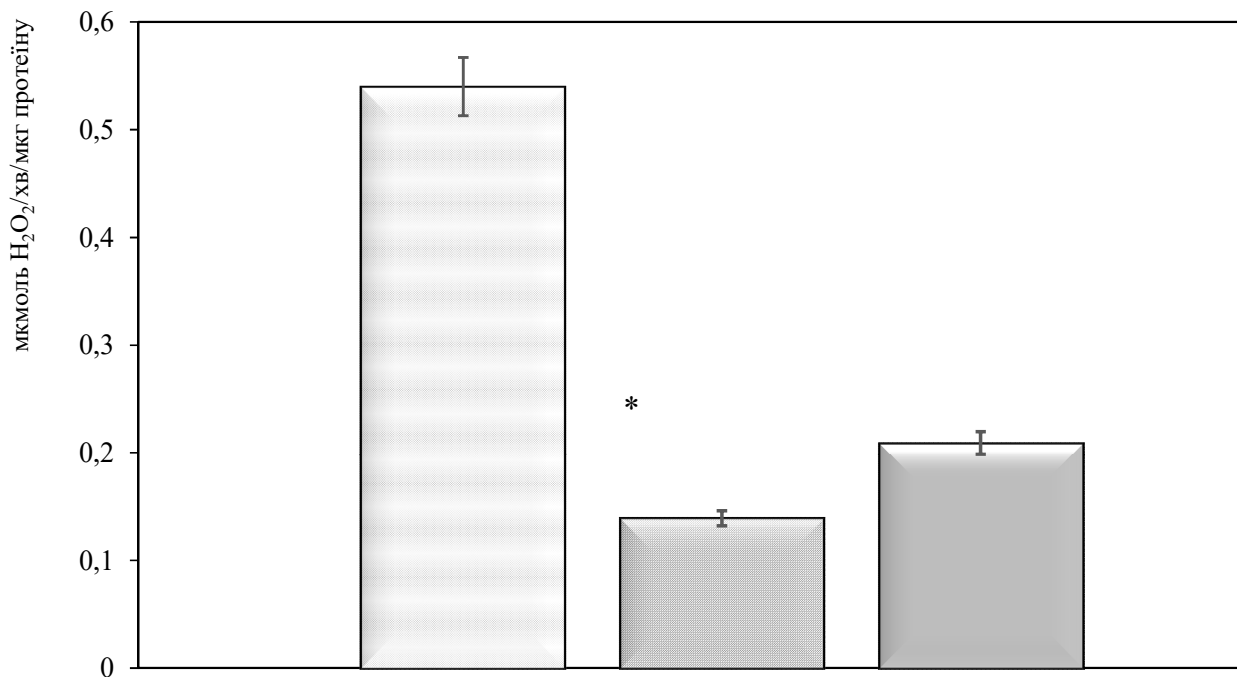
Рівень активності СОД до ГД був дещо нижчим у хворих з ХНН та ЦД 2-го типу порівняно з показниками хворих з ХНН без ЦД. Це може бути пов'язане з глікозилюванням ряду амінокислотних залишків СОД або впливом продуктів глікозилювання на процеси біосинтезу СОД. Після ГД активність СОД достовірно не змінювалась (табл. 4.7).

Таблиця 4.7 – Вміст у лізаті лімфоцитів ТБК-активних продуктів та активність СОД у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Групи досліджених	ТБК активні продукти мкмоль/л	СОД мкмоль НСТ/ хв·мг протеїну
Контроль	26±2,2	24±1,6
Лімфоцити до ГД	29,3±4,7 *	19,0±2,5 *
Лімфоцити після ГД	23,4±4,1 [#]	18,1±3,1

Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p < 0,05$); # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Активність каталази до ГД була значно нижчою у хворих з ХНН та ЦД 2-го типу порівняно з показниками хворих з ХНН без ЦД (рис. 4.6). Після ГД активність каталази залишалась на низькому рівні.



Примітка. * - достовірність змін відносно вихідних значень ($p < 0,05$).

Рисунок 4.6 – Активність каталази у лізаті лімфоцитів у хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу

Порівнюючи зміни активності СОД та каталази у хворих з ХНН з та без ЦД у лізаті лімфоцитів слід відзначити, що активність каталази більш виражено змінюється за умов гіперглікемії. У зв'язку з цим основну роль у розкладі пероксиду водню, що синтезує СОД, має забезпечувати глутатіонпероксидаза.

Таким чином, отримані результати свідчать про наявність певних особливостей змін показників NO –синтазної системи та про- і антиоксидантних процесів у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу порівняно з відповідними показниками хворих з ХНН без ЦД до та після ГД, що проявлялось у зміні активності NO-синтаз, активності каталази.

Отримані результати дали можливість зробити наступні висновки:

1. Рівень активності iNOS у лізаті лімфоцитів хворих з хронічною нирковою недостатністю та цукровим діабетом 2-го типу до гемодіалізу був значно вищим ($p < 0,01$), порівняно з показниками хворих на хронічною нирковою недостатністю без цукрового діабету у три рази ($p < 0,01$). Активність eNOS після гемодіалізу знижувалась у меншій степені, ніж у хворих з хронічною нирковою недостатністю без цукрового діабету.

2. Показники вмісту концентрації L-аргініну, нітрит-аніона, суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, гідроген сульфід, ТБК-активних продуктів, активності супероксиддисмутаза не мали суттєвої різниці у порівнянні з відповідними показниками хворих з хронічною нирковою недостатністю без цукрового діабету.

Отримані результати опубліковані у наступних працях: [28, 29, 30, 31, 32, 157].

РОЗДІЛ 5

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Хронічна ниркова недостатність (ХНН) є однією з глобальних та швидко зростаючих патологій нирок, що має несприятливий прогноз та високу смертність хворих. За умов ХНН відбуваються різні метаболічні порушення, у першу чергу, зростання продукції токсичних речовин обміну білків (сечовини, сечової кислоти, креатиніну, індикану).

За умов ХНН відзначається ендотеліальна дисфункція під якою розуміють зниження продукції нітрогену оксиду і, відповідно, наслідками чого є порушення процесів регуляції тонуусу судин, гемодинаміки, взаємовідношення між мембраною ендотеліоцитів та форменими елементами крові, у першу чергу тромбоцитами.

Останнім часом значну увагу приділяють вивченню зв'язку між прогресуванням хронічної хвороби нирок (ХХН) та розвитком різноманітних ускладнень із змінами системи L-аргінін/NO-синтази/аргіназа та оксидативним стресом [104, 167, 199].

ХНН часто супроводжується розвитком цукрового діабету 2-го типу, при цьому також проходять процеси, що викликають ендотеліальну дисфункцію. При діабетичній нефропатії, на ранній стадії спостерігається гіперфільтрація, наявність підвищення рівнів генерування NO. Одночасно, тяжка ступень протеїнурії, зниження швидкості клубочкової фільтрації, гіпертензія пов'язані з дефіцитом оксиду азоту [184].

За умов ЦД 2-го типу ключову роль у патогенезі діабетичних мікро- та макроангіопатій відіграє ендотеліальна дисфункція, основним проявом якої є порушення біодоступності NO внаслідок зниження його синтезу ендотеліальною NO-синтазою (eNOS) чи зменшення його пулу внаслідок взаємодії з супероксид-аніоном та утворенням цитотоксичного пероксинітриду [228].

Значну роль у функціонуванні серцево-судинної системи та функціонального стану клітин крові, у тому числі і лімфоцитів, відіграє система L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа. Показано, що сеанс ГД викликає зниження рівня нітритів, асиметричного диметиларгініну, гомоцистеїну [112].

Для хворих з ХНН значну роль відіграють катіонні амінокислоти і серед них L-аргінін. За умов уремії у хворих з ХНН, особливо виснажених, підвищується катаболізм катіонних амінокислот, їх вміст у крові знижується, тоді як зростає вміст у крові маркерів запалення і окисного стресу [208].

З амінокислоти L-аргініну за участю NO-синтази у клітинах синтезується нітрогену оксид. L-аргінін також метаболізують – аргіназа, аргініндекарбоксилаза, аргінін-гліцин-амідинотрансфераза. Аргіназа з гідролітично розщеплює L-аргінін до L-орнітину і сечовини та конкурує з NO-синтазою за L-аргінін [196, 198].

Амінокислота L-аргінін відіграє значну роль у багатьох процесах в організмі людини, її відносять до незамінних амінокислот, що необхідна для сперматогенезу, росту та розвитку плода, а також регуляції артеріального тиску, підтримання судинного тонуусу та гемодинаміки. Окрім цього, L-аргінін у організмі людини приймає участь у синтезі багатьох речовин: білків, креатиніну, сечовини, піримідинових основ; є прекурсором для синтезу нітрогену оксиду, агмантину та поліамінів, а також має антипроліферативну дію [77, 166].

Синтез в організмі людини L-аргініну з L-цитруліну відбувається у нирках та печінці. L-аргінін, що синтезується у печінці, у ній і метаболізується і не вносить значного внеску на рівень циркулюючого L-аргініну у плазмі крові. Основну роль у підтримці пула L-аргініну в крові відіграє синтезований у нирках L-аргінін. При патології нирок синтез L-аргініну знижується та зростають процеси катаболізму, за цих умов L-аргінін стає не замінимою амінокислотою [222].

Результати наших досліджень свідчать, що у хворих на ХНН концентрація L-аргініну у плазмі крові була на 33% ($p < 0,05$) меншою, ніж у плазмі крові контрольної групи обстежених. Це свідчить про знижену забезпеченість організму хворих на ХНН L-аргініном. Одним з факторів зменшення концентрації L-аргініну у хворих з ХНН є недостатнє харчування, що проявляється зниженням концентрації у плазмі крові амінокислот, у тому числі і L-аргініну [240]. Зниження концентрації у крові L-аргініну призводить до: зменшення ендogenous синтезу у нирках аргініну; порушення метаболізму L-аргініну за участі інших ферментів, у тому числі аргіназою; зниження транспорту L-аргініну у цитоплазму клітин; порушення процесів регенерації клітин канальців нирок [82].

Після гемодіалізу концентрація L-аргініну у плазмі крові зменшилась ще на 20% ($p < 0,05$), порівняно з показниками до ГД. Це свідчить про те, що сама процедура ГД викликає зниження концентрації L-аргініну у плазмі крові хворих на ХНН. У загальному порівнюючи дані після ГД та показники крові контрольної групи, концентрація L-аргініну у плазмі крові хворих на ХНН знижується майже у два рази. Подібна картина спостерігалась у хворих на ХНН та ЦД 2-го типу [26, 156].

Отже, зниження концентрації L-аргініну у плазмі крові спостерігалась у хворих на ХНН та у хворих на ХНН та з ЦД 2-го типу, що обумовлено у першу чергу порушеннями функцій нирок, сеанс ГД викликає посилення зниження вмісту вміст L-аргініну у плазмі крові, гіперглікемія виражено не впливала на вміст L-аргініну у плазмі крові хворих на ХНН та ЦД 2-го типу.

Розглядаючи зміни L-аргініну у лізаті лімфоцитів треба відмітити наступне: у порівнянні з показниками контрольної групи у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН концентрація L-аргініну була знижена на 31% ($p < 0,05$); порівнюючи концентрацію L-аргініну між плазмою крові та лізатом лімфоцитів, то у останніх його вміст був меншим на 33%. Градієнт концентрації L-аргініну між плазмою крові та цитоплазмою лімфоцитів у

хворих на ХНН становив 37,7 мкг/мл, у контрольній групі – 57,8 мкг/мл. Тобто, у хворих на ХНН відзначалось значне зниження градієнту концентрації L-аргініну між плазмою крові та цитоплазмою лімфоцитів.

Після проведення сеансу гемодіалізу, у порівнянні з показниками до ГД, концентрація L-аргініну у лізаті лімфоцитів зменшувалась на 30% ($p < 0,05$), тоді як у плазмі крові – на 20%. Співвідношення між плазмою крові та лізатом лімфоцитів у хворих на ХНН становило 32,8 мкг/мл. Тобто, сеанс ГД викликав значне зниження концентрації L-аргініну як у плазмі крові, так і лізаті лімфоцитів. Після ГД у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу зміни концентрації L-аргініну не мали суттєвої різниці у порівнянні з відповідними показниками хворих з ХНН без ЦД [27].

Враховуючи різницю концентрацій L-аргініну між плазмою крові та цитоплазмою лімфоцитів, у мембранному транспорті L-аргініну, згідно сьогоденних поглядів, приймає участь катіонний амінокислотний транспортер CAT-1 або система y^+ [178, 199]. Транспорт аргініну за участю системи y^+ (CAT-1) відносно рН незалежний, чутливий до транс-стимуляції та насичення циркулюючої плазми та ідентифікований у різних клітинах [144, 159, 219, 238]. Транспортер CAT-1 також експресується у ендотеліальних клітинах [165].

На сьогоднішній день значна увага дослідників приділяється вивченню ролі ендогенних аналогів аргініну таких як симетричного (СДМА) та асиметричного диметиларгініну (АДМА) за умов ХНН. У пацієнтів з хронічним захворюванням нирок, пошкодження ендотелія в капілярній системі мозкового шару нирок і супутніх судинних пошкоджень призводить до прогресування ураження ниркових клітин, а це в свою чергу викликає порушення азотовидільної функції і до подальшого прогресування ураження ниркової тканини, що безпосередньо призводить до термінальної стадії ХНН. В цьому аспекті синтез NO ендотеліальними клітинами за рахунок накопичення

ендогенних інгібіторів NO-синтази, таких як асиметричний диметиларгенін (АДМА) призводить до прискорення прогресування хронічної хвороби нирок.

За умов ниркової недостатності відбувається зростання експресії та активності АМПАМТ, що викликала зростання продукції АДМА у ендотеліальних клітинах [84]. АДМА утворюється з аргініну, що входить до ядерних білків, шляхом його метилування АМПАМТ. АДМА гальмує активність трьох ізоформ NO-синтаз, посилює адгезію моноцитів, активує експресію прозапальних та хемотактичних факторів, викликає зростання вмісту окисномодифікованих ліпопротеїнів у макрофагах [79]. Підвищення вмісту у плазмі крові АДМА розглядають як предиктор-фактор гострих кардіоваскулярних порушень у хворих з ХНН [81, 229].

Нами показано, що у плазмі хворих з ХНН концентрація АДМА була у 2,3 рази вищою ($p < 0,01$), а концентрація СДМА – у 3,4 рази ($p < 0,01$), ніж у крові контрольної групи обстежених. Це свідчить, що у хворих з ХНН на тлі зниження рівня у плазмі крові L-аргініну зростає концентрація продуктів розпаду ендогенних білків, які вміщують L-аргінін.

Одним з ключових питань сьогодення щодо хворих з ХНН є покращення якості та продовження тривалості їх життя. Враховуючи те, що основною причиною смерті хворих, які отримують лікування шляхом гемодіалізу, є патології серцево-судинної системи увага дослідників акцентується на механізмах регуляції тону судин. Зміна балансу між системними гормональними впливами (катехоламіни, ангіотензин тощо) та місцевими регуляторами (нітрогену оксид, гідроген сульфід, ендотелін-1, простагліцилін, похідний ендотелій полязизуючого фактора) у кровеносних судинах викликає зростання артеріального тиску та порушення балансу агрегатного стану крові.

За фізіологічних умов ключовою функцією нітрогену оксиду є регуляція функціонального стану серцево-судинної системи та участь у процесах вазодилатації. Синтезований eNOS ендотеліальних клітин нітроген оксид дифундує до гладких м'язів судин, взаємодіє з гемом гуанілатциклази

активуючи її, внаслідок чого остання синтезує цГМФ, який у свою чергу зв'язується з цГМФ-залежною протеїнкіназою внаслідок чого відбувається вазодилатація [99, 205].

Синтезований NO-синтазою нітрогену оксид впливає як на чисельні внутрішньоклітинні процеси, так і на навколишні клітини, що обумовлено його високою дифузійною здатністю внаслідок низької молекулярної маси та високої гідрофільності [183]. Нітрогену оксид може взаємодіяти з різними молекулами – гуанілатциклазою, гемоглобіном, мітохондральними ферментами, ферментами циклу Кребса, ферментами синтезу білка і ДНК [10].

Зниження продукції нітрогену оксиду eNOS ендотеліоцитами судин є ключовим фактором розвитку ендотеліальної дисфункції, що включає виникнення дисбалансу між місцевими процесами гомеостаза, проліферації, міграції клітин крові в судинну стінку, регуляцію судинного тонуса. Наслідком ендотеліальної дисфункції є розвиток артеріальної гіпертензії, атеросклерозу, порушенням функціонування внутрішніх органів та мозку [121, 239]. Слід відзначити, що вазодилатуючий ефект NO залежить від розміру артерій, найбільший ендотелій-залежний вазодилатуючий ефект проявляється на аорті і менший – у судинах резистентного типу [214].

Чисельні фактори викликають дефіцит синтезу нітрогену оксиду за умов ХНН. Серед них значна роль належить зниженню вмісту у плазмі крові L-аргініну та зростанню у крові ендогенних блокатора активності NOS – АДМА. Зниження синтезу NO у нирках викликає гіперволемію, підвищення концентрації натрію в крові, погіршення клубочкової фільтрації, розвиток вазоконстрикції, збільшення каналцевої реабсорбції води, що призводить до зростання синтезу ангіотензину II і, відповідно, до підвищення артеріального тиску і у подальшому до розвитку гломерулосклерозу та прогресування ниркової недостатності [185].

У наших дослідженнях до проведення гемодіалізу вміст NO_2^- у плазмі крові хворих на ХНН був дещо нижчим, ніж у плазмі крові контрольної групи.

Після гемодіалізу відзначено зниження NO_2^- , у порівнянні з показниками контрольної групи. При цьому сума нітратів та нітритів у плазмі крові зростала у 2,2 рази ($p < 0,05$), також у хворих на ХНН знижувалась частка вмісту NO_2^- у сумі нітратів та нітритів до 11%, тоді як у контролі вона становила 26%. Після гемодіалізу вміст $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у плазмі крові зменшувався на 24%. У хворих ХНН з ЦД 2-го типу концентрація NO_2^- була на рівні показників хворих з ХНН без ЦД, тоді як сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ у меншій мірі зростала (на 65%), у порівнянні з відповідними показниками хворих ХНН без ЦД.

Раніше проведеними дослідженнями було відзначено, що концентрація у плазмі крові нітратів у пацієнтів з ХНН була підвищена, що свідчить про тісний зв'язок між системою L-аргінін-нітрогену оксид за умов уремії [123, 138, 146, 189, 217].

Вміст нітрит-аніона у лізаті лімфоцитів, у порівнянні з плазмою крові хворих на ХНН, був дещо нижчим та його динаміка змін після ГД достовірно не відрізнялась від змін показників контрольної групи, що можливо обумовлено джерелами поступлення нітрогену оксиду – у плазму крові з ендотеліоцитів, у лімфоцитах нітроген оксид синтезується NO – синтазою. Показники суми нітрата+нітрити у лімфоцитах хворих на ХНН вказують на зростання нітрозомісних продуктів у плазмі крові, порівняно з лізатом лімфоцитів. У лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу зміни концентрації нітрит-аніона та сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ не мали суттєвої різниці у порівнянні з відповідними показниками хворих з ХНН без ЦД.

Оцінюючи зміни NO-синтази у лімфоцитах хворих з ХНН нами відзначено значне зростання активності iNOS (у 15 разів, $p < 0,01$), тоді як рівень активності eNOS знижувалась на 70% ($p < 0,05$). Отримані результати свідчать про різку активацію прозапального ензиму iNOS та утворення різних токсичних продуктів (пероксинітриту, нітротирозину тощо), що порушує метаболічні процеси у клітині, підвищує процеси ПОЛ та подальше зниження функції ендотеліоцитів.

Сеанс ГД викликає різке зниження рівня активності iNOS (у 14 разів, $p < 0,001$) та активності eNOS (у 8 разів, $p < 0,001$), що свідчить про надзвичайну чутливість лімфоцитарної NO-синтази до процедури ГД.

У лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу рівень активності iNOS був значно вищим ($p < 0,01$), порівняно з показниками групи донорів і також переважав показники хворих на ХНН без ЦД у три рази ($p < 0,01$). Активність eNOS була зниженою (на 20%), тоді як у хворих з ХНН без ЦД активність eNOS знижувалась на 64%, порівняно з показниками контрольної групи.

Сеанс ГД призводив до зменшення активності iNOS у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу у 3,6 рази ($p < 0,01$), активність eNOS також знижувалась у два рази порівняно з показниками до ГД. Отже, підвищення активності iNOS у лізаті лімфоцитів хворих на ХНН з ЦД 2-го типу, може обумовлено тим, що у цитоплазмі клітин відбувається нагромадження продуктів глікозилювання, які викликають зростання експресії гена iNOS.

При оцінці змін активності ізоферментів NO-синтази треба враховувати зміни активності аргінази, яка також метаболізує L-аргінін і активність якої є більш висока, ніж NO-синтази. У плазмі крові та лізаті лімфоцитів переважає другий тип аргінази. Вважають, що зростання активності аргінази та рівня ліпопротеїнасоційованої фосфоліпази (Lp-PLA2) із паралельним зниженням суми нітратів та нітритів може бути використано як маркер ендотеліальної дисфункції та асоціюватись з розвитком кардіоваскулярної патології у пацієнтів з ХНН [114].

Активність аргінази як у плазмі крові хворих з ХНН без ЦД, так і хворих на ХНН з ЦД 2-го типу, зростала, при цьому у хворих на ХНН з ЦД 2-го типу у більшій мірі (на 42%), ніж у хворих з ХПП без ЦД. Активність аргінази у лімфоцитах хворих на ХНН до ГД мала тенденцію до зменшення (на 14%, $p > 0,05$), порівняно з показниками контрольної групи обстежених, що обумовлено підвищенням активності iNOS. Активність аргінази після сеансу

ГД у хворих з ХНН зростала до вихідних показників, при цьому активність iNOS знижувалась.

Таким чином, зміна активності аргінази плазми крові та лімфоцитів у хворих з ХНН має свої особливості, що проявляється у зростанні її активності у плазмі крові, тоді як її активність у лімфоцитах мала тенденцію до зниження. Сеанс ГД призводив до зниження активності аргінази у плазмі крові, у лізаті лімфоцитів достовірних змін не відзначено.

У загальному отримані результати вказують на значні зміни у функціонуванні системи системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа плазми крові та лімфоцитах хворих на ХНН та хворих на ХНН з ЦД 2-го типу, що можуть викликати подальші зміни функціонування серцево-судинної системи, які викликають летальних наслідок.

Важливою молекулою, що відіграє значну роль у регуляції серцево-судинної системи є гідрогену сульфід. Відомо, що дія H_2S пов'язана з регуляцією тонуусу судин, антиоксидантною дією, впливом на гломерулярну фільтрацію та реабсорбцію іонів натрію [126, 135].

За умов рН 7.4 розчина біля 14% вільної сірки знаходиться у вигляді H_2S , більш ніж 80% у вигляді HS^- і решта – S^{2-} . У серцево-судинній системі H_2S переважно синтезує цистатіон-гама-ліаза як у ендотеліальних, так і у гладком'язових клітинах судин. Говорячи про участь H_2S у регуляції тонуусу судин слід відзначити, що описано як вадиліаційний, так і вазоконстрикторний ефекти при дії H_2S . При високих концентраціях відзначена вазодиліація, при низьких – вазоконстрикція. Вазоконстрикторний ефект пов'язують із зниженням рівня у гладком'язових клітинах аденозинмонофосфату, вазодиліація при дії H_2S відбувається за умов індуцированія гіперполяризації при стимуляції K_{ATP} , K_V та $KCNQ$ калієвих каналів мембран клітин [92].

Нашими дослідженнями показано, що концентрація H_2S у плазмі крові хворих з ХНН до ГД була значно меншою (на 23%, $p < 0,05$), ніж у плазмі крові

групи донорів. Після ГД концентрація H_2S у плазмі крові знизилась ще більш виражено. Тобто, сеанс ГД викликає зменшення вмісту H_2S у циркулюючій крові, що може викликати зростання тонуусу судин. Вміст у крові H_2S може виступати як чутливий маркер порушень регуляторних змін у кровоносних судинах. Подібні зміни H_2S у крові хворих на ХНН також були відзначені у дослідженнях ряду авторів [141].

Згідно сучасних уявлень між нітроген оксидом та гідроген сульфідом існують тісні як функціональні зв'язки, так і молекулярні взаємодії. Взаємодія NO та H_2S призводить до утворення їх похідних – нітрозоперсульфіду (SSNO), SULFI/NO [ON(NO)SO₃], нітроксилу (HNO) тощо. На рівні ендотеліальних клітин вплив H_2S може стимулювати вивільнення NO з нітриту, нітрозотіолів, комплексу метал-нітрозил [197]. З іншої сторони нітрити можуть стимулювати продукцію та вміст H_2S у крові. За фізіологічних умов взаємодія між H_2S та NO пов'язана з тим, що H_2S стимулює активність eNOS декількома шляхами: мобілізуючи кальцій, АКТ-пов'язаним фосфорилюванням, сульфгідруванням Cys443 у молекулі eNOS, активуючи експресію eNOS або активність протеїнкінази G. З іншої сторони кооперація між H_2S та NO на рівні судин за умов введення H_2S викликала зростання продукції NO, потенціювало вазодилатуючий ангіогенний ефекти NO; блокування синтезу H_2S у судинах призводило до зниження ефектів NO; зниження функціонування NO-вазодилатуючого сигнального шляху знижувало ефекти H_2S [231, 233].

Отже, згідно отриманим даним у хворих з ХНН ключовим аспектом є зниженням у плазмі крові вазодилататорів (NO та H_2S) та зростання вмісту ендогенних похідних L-аргініну (ADMA та CDMA), що викликає розвиток ендотеліальної дисфункції.

Для хворих з ХНН є характерним зростання тонуусу симпатичного відділу вегетативної нервової системи, що обумовлено психічним напруженням пов'язаним з перебігом хвороби. Активація симпатичного відділу вегетативної нервової системи та гіпоталамо-гіпофізано-наднирникової системи при стресі

призводить до зростання виділення у крові катехоламінів. Стрес викликає ушкодження ендотеліальних клітин та їх дисфункцію. Психологічний стрес є значним фактором розвитку, прогресії та проявів серцево-судинних патологій [214]. У пацієнтів з ХНН, які мали серцево-судинні ускладнення, концентрація норадреналіну була вищою, у порівнянні з тими, хто не мав ускладнень зі сторони серцево-судинної системи [212].

Нашими дослідженнями показано, що концентрація норадреналіну в плазмі хворих з ХНН була значно вищою, ніж у обстежених контрольної групи, тоді як концентрація адреналіну та дофаміну статистично достовірно не відрізнялася від показників контрольної групи. Також не було виявлено статистично достовірної різниці концентрації катехоламінів у жінок і чоловіків з ХНН порівняно з контрольною групою.

Після сеансу гемодіалізу в хворих із термінальною стадією ниркової недостатності концентрації норадреналіну в плазмі знижувалась у порівнянні з його вмістом перед процедурою. Концентрації адреналіну та дофаміну плазми крові статистично достовірно не змінювались до і після гемодіалізу. Отримані результати свідчать про значну роль норадреналіна у механізмах зростання артеріального тиску хворих на ХНН, при цьому це не залежало від статі.

Останніми роками доведено, що між впливом стресу та NO-синтазною системою на різних регуляторних рівнях існують тісні взаємозв'язки: у центральних нейронах (різних відділах ЦНС), периферійних клітинах та клітинах наднирників [214].

Стрес супроводжується зростанням артеріального тиску. Відзначена неоднозначна роль ізоформ NO-синтази у розвитку гіпертензії за умов дії стресу. У наших дослідженнях було показано зростання у крові концентрації норадреналіна у хворих з ХНН і не відзначено зміни концентрації адреналіна та дофаміна, що є предметом подальших досліджень. Норадреналін активуючи β -адренорецептори викликає скорочення гладких м'язів та призводить до гіпертензії. Окрім цього, за умов ХНН зростає активність iNOS у лімфоцитах,

що активує надпродукцію NO та утворення пероксинітриту. На цьому тлі знижується активність eNOS, що синтезує вазопротекторний NO. У наших дослідженнях рівень циркулюючого NO знижувався, що обумовлено, ймовірно, декількома факторами: зменшенням продукції NO ендотеліальними клітинами та його біодоступністю, різким зниженням у крові субстрату для синтезу NO – L-аргініну; можливим зменшенням рівня експресії eNOS. Підвищення активності iNOS у лімфоцитах може викликати дисфункцію останніх.

Отже, механізм вазоконстрикції обумовлений змінами ряду факторів – з однієї сторони зростанням виділення норадреналіна, а з другої - зниженням продукції місцевих регуляторних вазодилітаторів - NO та гідроген сульфід.

Ключовим аспектом при ХНН є розвиток оксидативного стресу. Вважається, що оксидативний стрес є раннім проявом при ХНН та посилює розвиток захворювання [82, 137, 148]. Високі рівні сечовини, що спостерігаються у пацієнтів з ХНН, посилюють оксидативний стрес. Оксидативний стрес в нирках і судинах тканин призводить до підвищення артеріального тиску.

У наших дослідженнях у плазмі хворих на ХНН до ГД відзначено зростання вмісту ТБК-активних продуктів на 34% ($p < 0,05$), у порівнянні з показниками групи донорів, що свідчить про посилення оксидативних процесів. Після гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів зменшився на 14% ($p < 0,05$). У хворих на ХНН з ЦД 2-го типу не відзначено суттєвих відмінностей порівняно з показниками хворих без ЦД. Отже, сеанс гемодіалізу знижує вміст ТБК-активних продуктів, однак не показники не досягають рівня показників групи донорів. Вміст ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів був значно меншим, ніж у плазмі крові.

Серед компонентів антиоксидантної системи значну роль відіграють ензими – супероксиддисмутаза (СОД), каталаза та глутатіонпероксидаза, а також важливе значення має не ферментативний компонент системи – вітамін С.

Слід відзначити, що у плазмі хворих на ХНН, у порівнянні з показниками контрольної групи, активність СОД, каталази та глутатіонпероксидази змінювались недосто­вір­но, що ймовірно пов'язано з вичерпанням компенсаторних механізмів захисту. Тоді як концентрація вітаміну С, як загальної його форми, так і окисненої знижувались – на 41% ($p > 0,05$) та на 22%, відповідно, у порівнянні з показниками контрольної групи.

Активність СОД у плазмі крові хворих на ХНН з ЦД 2-го типу була нижчою, тоді як активність каталази була на 38% ($p < 0,05$) менше, ніж у хворих з ХПП без ЦД. Активність мієлопероксидази також була меншою, ніж у хворих з ХПП без ЦД.

Після гемодіалізу концентрація вітаміну С достовірно знижувалась, у порівнянні з показниками до ГД, вміст загальної форми вітаміну С зменшився на 23% ($p < 0,05$), окисненої форми – на 22% ($p < 0,05$). Звертає на себе увагу те, що сеанс гемодіалізу суттєво не впливає на активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту, тоді як концентрація вітаміну С знижувалась у порівнянні з показниками контрольної групи та станом до гемодіалізу, що необхідно враховувати при лікуванні хворих на ХНН. У хворих на ХНН з ЦД 2-го типу загальний вміст вітаміну С та його окиснена форма достовірно не відрізнялись від показників хворих ХПП без ЦД.

Слід враховувати те, що метаболізм вітаміну С призводить до утворення оксалатів. Для зменшення негативної дії оксалатів на нирки рекомендована доза вітаміну С для хворих з ХНН знижена до 50 мг/день [76].

Таким чином, отримані результати з однієї сторони свідчать про зростання процесів ліпопероксидації у хворих з ХНН з та без ЦД і після сеансу гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів знижувався як у плазмі крові, так і лізаті лімфоцитів. Активність ензимів антиоксидантної системи (активність СОД, каталази та глутатіонпероксидази), у порівнянні з показниками контрольної групи, змінювались недосто­вір­но, тоді як вміст вітаміну С різко

знижувався. Особливістю змін антиоксидантної системи у хворих з ХНН та наявністю ЦД 2-го типу є нижча активність СОД та каталази у плазмі крові.

Проведені дослідження виявили особливості змін у системі L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа, процесів ліпопероксидації у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих з ХНН з та без ЦД до та після гемодіалізу. Отримані результати дають змогу не тільки поглибити існуючі погляди на патогенез ХНН, а також є підґрунтям для рекомендацій по корекції лікування хворих з цією патологією, що у першу чергу стосується змін L-аргініну та вітаміну С у плазмі крові. Оцінка змін активності NO-синтази, нітрит-аніону, L-аргініну та ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів може служити прогностичним критерієм прогресування розвитку хронічної ниркової недостатності та фактором ризику ускладнень серцево-судинної системи.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та досягнуто вирішення наукової задачі – встановлені особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа, оксидативних процесів та зміни рівнів їх модуляторів в плазмі крові та лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю (ХНН) різної етіології залежно від сеансу гемодіалізу.

1. У хворих на ХНН до гемодіалізу виявлялись достовірні зміни стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у плазмі крові вміст L-аргініну був меншим (на 33%), сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ зросла (у 2,2 рази); у лізаті лімфоцитів активність iNOS зросла у 15 разів ($p < 0,01$), активність eNOS (на 70%) та вміст L-аргініну (на 31%) були нижчими порівняно з контролем. Сеанс гемодіалізу у хворих на ХНН спричиняв достовірні зміни знижував активність iNOS (в 14 разів), вміст L-аргініну (на 31%) та нітрит-аніону (на 21%) у лізаті лімфоцитів. У хворих з ХНН на тлі цукрового діабету 2-го типу рівень активності iNOS у лізаті лімфоцитів до гемодіалізу був значно меншим (в 6,5 рази, $p < 0,01$), а активність eNOS вища (на 20%); після гемодіалізу активність iNOS знижувалась менш значуще (у 3,3 рази, $p < 0,01$), ніж у хворих на ХНН на тлі гломерулонефриту.

2. У хворих на ХНН до гемодіалізу в плазмі крові вміст модуляторів системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа - асиметричного та симетричного диметиларгініну був вищим (у 2,3 та 3,4 рази, $p < 0,01$), ніж в групі контролю. Після гемодіалізу концентрації асиметричного та симетричного диметиларгініну у плазмі крові хворих на ХНН зменшились на 49% та 48% ($p < 0,05$), відповідно.

3. Концентрація гідроген сульфід у плазмі крові хворих з ХНН до гемодіалізу була меншою на 23% ($p < 0,05$), проте у лізаті лімфоцитів суттєво не відрізнялась від показника контрольної групи. У хворих на ХНН після

гемодіалізу концентрація H_2S у плазмі крові знизилась на 12% ($p < 0,05$), а у лізаті лімфоцитів знизилась на 23% ($p < 0,05$), відповідно.

4. У хворих з ХНН до гемодіалізу виявлявся дисбаланс в обміні катехоламінів – рівень норадреналіну в плазмі був вищим (у 2,3 рази, $p < 0,01$), але рівні адреналіну та дофаміну достовірно не відрізнялись від показників контрольної групи. Після сеансу гемодіалізу концентрація норадреналіну в плазмі крові хворих на ХНН достовірно знижувалась на 24% ($p < 0,01$) у порівнянні з вихідним рівнем, в той час як концентрації адреналіну та дофаміну суттєво не змінились.

До гемодіалізу у хворих з ХНН в плазмі крові та лімфоцитах реєструвалось підвищення активності процесів ліпопероксидації (рівень ТБК-активних продуктів був вищим на 33% та 23%, $p < 0,05$, відповідно), тоді як концентрація загальної та окисненої форми вітаміну С в плазмі крові була нижчою (на 45% та 19%, $p < 0,05$) у порівнянні з показниками контрольної групи. Після гемодіалізу у хворих на ХНН вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах та плазмі крові зменшився на 22% та 15% ($p < 0,05$), а концентрація загальної та окисненої форми вітаміну С в плазмі крові знизилась на 27 % та 25% ($p < 0,05$), відповідно. У хворих з ХНН активність СОД та каталази в лізаті лімфоцитів до і після гемодіалізу була нижчою на 19-25% ($p < 0,05$), а активність глутатіонпероксидази достовірно не відрізнялась у порівнянні з показниками контрольної групи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Активність аргінази в лімфоцитах периферичної крові у хворих на ревматоїдний артрит та анкілозивний спондилоартрит / Личковська Н.Е., Фафула Р.В., Єфремова У.П. та ін. // Світ медицини та біології. 2011. № 2. С. 125–129.

2. Активність процесів пероксидації та антиоксидантного захисту у хворих на хронічну хворобу нирок V стадії залежно від їх харчового статусу / Король Л.В., Дудар І.О., Мигаль Л.Я. та ін. // Вісник проблем біології і медицини. 2010. Вип. 3. С. 149-152.

3. Активность NO-синтаз и агрегационные свойства нейтрофилов у больных хронической болезнью почек в динамики лечения / Топчий И.И., Щербань Т.Д., Оксененко С.В. и др. // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2009. № 1. С. 39–42.

4. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии. М.: Высшая школа, 2000. 239 с.

5. Антиоксидантна система, церулоплазмін-трансферин та стан коморбідності у хворих на хронічну хворобу нирок, які лікуються гемодіалізом / Король Л.В., Мигаль Л.Я. та ін. // Український журнал нефрології та діалізу. 2011. № 4. С. 35-39.

6. Біловол О.М., Топчій І.І., Денисенко В.П. Роль механізмів запалення в розвитку артеріальної гіпертензії при діабетичній нефропатії // Медицина транспорту України. 2012. № 3. С. 17–21.

7. Бондарь И.А., Климонтов В.В. Ранние маркеры диабетической нефропатии // Клинич. нефрология. 2010. № 2. С. 60–65.

8. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Вплив аміногуанідину на процес окисної модифікації білків за умов експериментального цукрового діабету у щурів // Укр. біохім. журн. 2006. Т. 78, № 5. С. 114–119.

9. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. 2008. Т. 54, № 1. С. 63–68.

10. Ванін А.Ф. Оксид азота и его обнаружение в биосистемах методом электронного парамагнитного резонанса // Успехи физических наук. 2000. Т. 170, № 4. С. 455–458.

11. Взаємозв'язок процесів перекисного окислення ліпідів та хронічного запалення з атеросклеротичними змінами судин та показниками ендотеліальної дисфункції у хворих на ХХН II-IV стадіями / Лобода О.М., Красюк І.В., Алексеєва В.В. та ін. // Український журнал нефрології та діалізу. 2015. № 1. С. 13–20.

12. Взаимосвязь уровня оксида азота с показателями гомеостаза у больных с миомой матки / Голиков П.П., Тихомирова Н.И., Клычникова Е.В. и др. // Вестник интенсивной терапии. 2005. № 2. С. 54–58.

13. Власова С.Н., Переспешина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лабораторное дело. 1990. Вып. 8. С. 19–22.

14. Волкова Н.И. Спорные вопросы диабетической нефропатии (ч. I) // Клинич. нефрология. 2011. № 3. С. 75–78.

15. Воробець З.Д., Єфремова У.П., Якубець О.І. Аргіназна система в організмі людини при розвитку патологічних процесів // Клінічна та експериментальна патологія. 2012. Т. 11, № 3, ч. 2. С. 153–160.

16. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету / Сагач В.Ф., Присяжна О.Д. та ін. // Фізіол. журн. 2005. Т. 51, № 2. С. 3–7.

17. Вплив альдостерону на продукцію PAI-1 у хворих на діабетичну нефропатію / Топчій І.І., Денисенко В.П., Гальчинська В.Ю. та ін. // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2011. № 1. С. 29–34.

18. Вплив лікування та активність NO-синтаз та вміст стабільних метаболітів оксиду азоту у хворих на діабетичну нефропатію / Топчій І.І., Тверетінов А.Б., Денисенко В.П. та ін. // Медицина сегодня и завтра. 2007. № 2. С. 98–102.

19. Вплив сеансу гемодіалізу на структурно-функціональний стан ендотелію у хворих із термінальною нирковою недостатністю / Гоженко А.І., Сусла О.Б. та ін. // Український журнал нефрології та діалізу. 2013. № 3 (39). С. 102-107.

20. Граник В.А. Метаболизм L-аргинина (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т. 37, № 2. С. 3–20.

21. Диабетическая нефропатия (обзор литературы). Сообщение 2 / Дадык А.И., Багрий А.Э., Щукина Е.В. и др. // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2011. № 1. С. 51–58.

22. Динамика морфологических показателей тромбоцитов периферической крови как критерий оценки тромбогенности диализных мембран / Власова Е.А., Василенко И.А. и др. // Урология. 2011. № 2. С. 36–40.

23. Драпкина О.М., Ивашкин В.Т. Оксид азота и сердечная недостаточность // Терапевт. архив. 2005. Т.11. С. 62-68.

24. Дрель В.Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу // Біологічні студії. 2010. Т. 4, № 2. С. 141–158.

25. Дудар І.О., Лобода О.М., Король Л.В. Прогресування хронічної хвороби нирок: стан оксидантного стресу на різних стадіях ХХН // Український журнал нефрології та діалізу. 2012. Т. 2. № 34. С. 18-24.

26. Іваночко Р.Б., Білецька Л.П., Склярів О.Я. Зміни показників системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2014. № 1. С. 66–71.

27. Іваночко Р.Б., Склярів О.Я. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // Медична біохімія. 2014. № 2. С. 26–30.(18)

28. Іваночко Р.Б., Склярів О.Я. Зміни концентрації L-аргініну, нітрогену оксиду та активності аргінази у плазмі крові та лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // The Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86, N 5. С. 75–76.

29. Іваночко Р.Б. Вплив сеансу гемодіалізу на систему NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015: тези доп. конференції-конкурсу молодих учених (м. Київ, 23-24 квітня 2015 р.). К., 2015. С. 29.

30. Іваночко Р.Б. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах хворих, які отримують замісну ниркову терапію // Третя міжнар. наукова конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології», м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015 р. Дніпропетровськ : вид-то Арбуз, 2015. С. 122–123.

31. Іваночко Р.Б. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з діабетичною нефропатією до та після сеансу гемодіалізу // Український журнал нефрології та діалізу. 2015. № 3. С. 53–57.

32. Іваночко Р.Б. Пат. № 110109 України, МПК G01N 33/48 (2006.01). Спосіб прогнозування стану хворих з діабетичною нефропатією за умов гемодіалізу / №u201603129 ; Бюл. № 18.

33. Кирпатовский В.И., Казаченко А.В., Надточий О.Н. Оксид азота как медиатор адаптогенных и цитотоксических эффектов при ишемии почки Урология. 2007. № 1. С. 71–75.

34. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // Лабораторна діагностика. 2001. № 3. С. 43-45.
35. Колесник М.О. Діабетична нефропатія: up to date (Частина 1) // Therapia. Український медичний вісник. 2015. № 12. С. 13–17.
36. Колесник М.О. Діабетична нефропатія: up to date (Частина 2) // Therapia. Український медичний вісник. 2016. № 1. С. 12–17.
37. Королюк М.А., Иванова Д., Майорова И. Метод орпеделения активности каталазы // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16-18.
38. Красний М.Р. Метаболічні і ультраструктурні зміни при експериментальній діабетичній нефропатії та їх корекція антиоксидантними вітамінами С і Е : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.14 «Ендокринологія». Харків, 2014. 26 с.
39. Красюк Е., Алексеева В. Перспективи застосування медикаментозної корекції перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту при хронічній хворобі нирок // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2010. № 3. С. 68–74.
40. Лапчинская И.И., Кишко Р.М., Семенец Е.Л. Хроническое воспаление у пациентов на гемодиализе // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2009. № 1. С. 52–58.
41. Лисенко Т.П. Судинні ускладнення цукрового діабету: сучасні методи інструментальної діагностики // Медицина сьогодні і завтра. 2014. № 1. С. 73–77.
42. Лобода А.М. Мікроелементні порушення у дітей // Современная педиатрия. 2009. № 1. С. 89–91.

43. Майданник В.Г., Бурмака Є.А. Патолофізіологічна роль радикальних форм кисню та оксиду азоту при патології нирок // Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2010. Т. 72, № 1. С. 7–14.

44. Майданник В.Г., Бурмака Є.А. Роль радикальних форм кисню та оксиду азоту при фізіологічних процесах в нирках // Педіатрія, акушерство та гінекологія. 2009. Т. 71, № 6. С. 28–40.

45. Метод определения активности каталазы / М.А. Корлюк, Л.И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лабораторное дело. 1988. № 1. С. 16–19.

46. Моин В. М. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах // Лабораторное дело. 1986. № 12. С. 724–727.

47. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению / Смирнов А.В., Шилов Е.М., Добронравов В. А. и др. // Клиническая нефрология. 2012. № 4. С. 4–26.

48. Нейко Є.М., Соломчак Д.Б. Сучасні погляди на етіопатогенез хронічного пієлонефриту // Галицький медичний вісник. 2001. № 2. С. 156–161.

49. Пашковська Н.З., Мецишен І.Ф. Диференційні особливості показників про- та антиоксидантної систем плазми крові хворих на діабетичну енцефалопатію залежно від типу основного захворювання // Буковинський медичний вісник. 2007. Т. 11, № 4. С. 44–48.

50. Перекисное окисление липидов и метаболизм оксида азота у больных хронической болезнью почек в динамике лечения / Топчий И.И., Кириенко А.Н., Бондарь Т.Н. и др. // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2012. № 1. С. 3–8.

51. Порушення ендотелійзалежних судинних реакцій аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії / Сагач В.Ф., Базілюк О.В. та ін. // Фізіол. журнал. 2000. Т. 46, № 3. С. 3–12.
52. Прогностичне значення визначення індексу оксидативного стресу у сироватці крові хворих на пієлонефрит / Король Л.В., Мигаль Л.Я. та ін. // Український журнал нефрології та діалізу. 2014. № 1. С. 29–33.
53. Ребров Б.А. Поражение почек при сахарном диабете // Міжнародний ендокринологічний журнал. 2011. № 2. С. 51–55.
54. Ромаданова О.І. Клініко-метаболичні особливості хворих з первинним гломерулярним ураженням на різних стадіях, хронічної хвороби нирок // Укр. журн. нефрології та діалізу. 2010. № 3. С. 50–54.
55. Сапаций А.Л., Купновицька І.Г. Метаболичні особливості оксиду азоту у формуванні ендотеліальної дисфункції за серцево-судинних захворювань // Ліки України. 2008. № 6. С. 82–86.
56. Семенових П. С. Функціональні властивості моноцитів та активність урокінази у хворих на діабетичну нефропатію в динаміці лікування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.02 «Внутрішні хвороби». Харків, 2010. 17 с.
57. Сибірна Н.О., Бурда В.А., Люта М.Я. Активність різних ізоформ NO-синтази еритроцитів за умов цукрового діабету 1 типу // Клінічна та експериментальна патологія. 2004. Т. 3, № 2, ч. 1. С. 221–212.
58. Скробонська Н.А., Цимбал Т.С. Діабетична нефропатія: деякі нетрадиційні фактори патогенезу, основні напрями діагностики та лікування (огляд літератури) // Сімейна медицина. 2011. № 4. С. 18–22.
59. Сумбаев В.В., Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс // Совр. пробл. токсикологии. 2000. № 3. С. 3–7.

60. Терещенко Н.Л. Використання стимуляторів синтезу оксиду азоту в комплексному лікуванні хворих на хронічний пієлонефрит // Урологія. 2004. № 1. С. 65–69.

61. Тимурбулатов М.А., Селезнев Е.И. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. Лабораторное дело. 1981. № 4. С. 209–211.

62. Топчий И.И. Окислительный стресс, повышение содержания асимметричного диметиларгинина и разобщенность NO-синтаз как фактор развития артериальной гипертензии при хронической болезни почек // Укр. терапевтич. журн. 2007. № 3. С. 8–15.

63. Топчий И.И., Денисенко В.П., Смолкин М.Г. Роль мельдония в комплексном лечении больных с диабетической нефропатией и артериальной гипертензией // Український терапевтичний журнал. 2014. № 2. С. 45–50.

64. Факторы риска прогрессирования диабетической нефропатии у больных с длительным течением сахарного диабета по данным ретроспективного анализа / Шестакова М.В., Кошель Л.В. та ін. // Терапевтический архив. 2006. Т. 78, № 5. С. 60–64.

65. Хуторська Л.А. Поширеність, абсолютний і відносний ризик розвитку діабетичної нефропатії у хворих на цукровий діабет // Буковинський мед. вісник. 2012. Т. 16, № 4. С. 170–175.

66. Цимбал Т.С. Особливості патогенезу та лікування ранніх стадій діабетичної нефропатії (огляд літератури та власні дані) // Ендокринологія. 2013. Т. 18, № 4. С. 63–70.

67. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. Лабораторное дело. 1991. № 10. С. 9–13.

68. Ших Е.В. "Витаминеральная" недостаточность // Український медичний часопис. 2005. № 1. С. 88-91.

69. Шпаков А.Е. К методике отдельного определения общей, редуцированной и дегидроаскорбиновой кислот // Лабораторное дело. 1967. № 5. С. 305–306.

70. Эндотелиальная дисфункция у пациентов с сахарным диабетом / Bagi Z., Feher A., Dou H. et al. // Практична ангиологія. 2014. № 3. С. 38–39.

71. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure / Mendes-Ribeiro A.C., Brunini T.M. C. et al. // Cardiovasc Res. 2001. Vol. 49. P. 697–712.

72. Activation of L-arginine transport in peripheral blood mononuclear cells in chronic renal failure / Brunini T.M. C., Roberts N.B., Yaqoob M.M. et al. // Pflugers Arch. 2002. Vol. 445. P. 147–151.

73. Airway nitric oxide release is reduced after PBS inhalation in asthma / Shin H. W., Shelley D. A., Henderson E. M. et al. // J. Appl. Physiol. 2007. Vol. 102, № 3. P. 1028–1033.

74. Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases / Lee J., Bae E.H., Ma S.K., Kim S.W. // Chonnam. Med. J. 2016. Vol. 52, N 2. P. 81–90.(130)

75. Anti-GBM glomerulonephritis in mice lacking nitric oxide synthase type 2 / Cattell V., Cook H.T., Ebrahim H. et al. // Kidney Int. 1998. Vol. 53, N 4. P. 932–936.

76. Antioxidant vitamins status in children and young adults undergoing dialysis: A single center study / Naseri M., Shahri H.M., Horri M. et al. // Ind. J. Nephrol. 2015. Vol.25, N 4. P. 206–212.

77. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease / Wu G., Bazer F., Davis T. et al. // Amino Acids. 2009. № 1. P. 153–168.

78. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is a novel emerging risk factor for cardiovascular disease and the development of renal injury in chronic kidney disease

/ Ueda S., Yamagishi S., Matsumoto Y. et al. // Clin. Exp. Nephrol. 2007. Vol. 11, N 2. P. 115-121.

79. Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation / Smirnova I.V., Kajstura M. Et al. / Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004. Vol. 287, N 2. P. 782-790.

80. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease - possible candidates for paradoxical epidemiology? / Busch M., Fleck C. Et al. // Amino Acids. 2006. Vol. 30, N 3. P. 225-232.

81. Asymmetrical dimethylarginine: a novel risk factor for coronary artery disease / Lu T.M., Ding Y.A. et al. // Clin Cardiol. 2003. Vol. 26, N 10. P. 458-464.

82. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease // Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. 2008. Vol. 294, N 1. F1-9.

83. Bełtowski J. Hydrogen sulfide in pharmacology and medicine - An update // Pharmacol Rep. 2015. Vol. 67, N 3. P. 647-658.

84. Bełtowski J., Kedra A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy // Pharmacol. Rep. 2006. Vol. 58, N 2. P. 159-178.

85. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system / Moens A.L., Yang R. et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2010. Vol. 48, № 6. P.1088-1095.

86. Biochemical changes in neutrophils of cervical cancer patients treated with ⁶⁰Co / Krishnamurthy V., Gunalan G. et al. // Current Sci. 2008. Vol. 94, N 9. P. 1995-1999.

87. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide // Methods Mol. Biol. 2011. Vol. 677. P. 375-393.

88. Böger R.H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor // J. Nutr. 2004. Vol. 134, suppl. 10. S. 2842-2847.(71)

89. Boychuk T.M., Gtytsiuk M.I. Diabetic nephropathy : shortreview // Клінічна та експериментальна патологія. 2014. Т. 13, № 2. С. 193–198.
90. Boyum A.A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968. Vol. 21, Suppl., 97. P. 51-76.
91. Bradley P.P., Christensen R.D., Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation // Blood. 1982. № 60. P. 618-622.
92. Cacanyiova S., Berenyiova A, Kristek F. The role of hydrogen sulphide in blood pressure regulation // Physiol Res. 2016. Vol. 65 (Suppl. 3). P. S273-S289.
93. Cao X., Bian J.S. The Role of Hydrogen Sulfide in Renal System// Front Pharmacol. 2016. Vol. 7. P. 385-397.
94. Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis / de Jager D.J., Grootendorst D.C., Jager K.J. et al. // JAMA. 2009. Vol. 302, N 16. P. 1782-1789.
95. Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H₂S and S-nitrosothiols / Filipovic M.R., Miljkovic J. Lj., Nauser T. et al. // J. Amer. Chem. Soc. 2012. Vol. 134, №29. P.12016-12027.
96. Chen K., Pittman R.N., Popel A.S. Nitric oxide in the vasculature: where does it come from and where does it go? A quantitative perspective // Antioxid. Redox. Signal. 2008. Vol. 10, № 7. P. 1185–1198.
97. Chen L. Y., Mehta J. L. Evidence for the presence of L-arginine–nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function // J. Cardiovasc. Pharmacol. 1998. Vol. 32. P. 57–61.
98. Chromek M., Current A.B. Urinary Tract Infection. Why Do Some Children Get Complications, While Others Don't? // Pediatric Reviews. 2007. Vol. 3, № 1. P. 35–43.
99. Cockrill B.A., Waxman A.B. Phosphodiesterase-5 inhibitors // Hand Exp. Pharmacol. 2013. Vol. 218. P. 229–255.

100. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure / MacAllister R.J., Rambausek M.H., Vallance P. et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996. Vol. 11. P. 2449–2452.

101. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients / Morena M., Cristol J.P., Bosc J.Y. et al. // *Nephrol. Dial. Transplant.* 2002. Vol. 17, N 3. P. 422–427.

102. Correlation of Lower Concentrations of Hydrogen Sulfide with Activation of Protein Kinase C β II in Uremic Accelerated Atherosclerosis Patients / Wang W., Feng S.-J., Li H. et al. // *Chinese Medical Journal.* 2015. Vol. 128, № 11. P. 1465-1470.

103. Current status of platelet NO synthases / Berkels R., Stockklauser K. et al. // *Thromb. Res.* 1997. Vol. 87. P. 51–55.

104. Del Vecchio L., Locatelli F., Carini M. What we know about oxidative stress in patients with chronic kidney disease on dialysis-clinical effects, potential treatment, and prevention // *Semin Dial.* 2011. Vol. 24, N 1. P. 56-64.

105. Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine in Serum from Patients with Chronic Kidney Disease: UPLC-MS/MS versus ELISA / Boelaert J., Schepers E., Glorieux G. et al. // *Toxins (Basel).* 2016. Vol.13, N 8. pii: E149.

106. Deves R., Angelo S., Chavez P. N-Ethylmaleimide discriminates between two lysine transport systems in human erythrocytes // *J. Physiol. (London).* 1993. Vol. 468. P. 753–766.

107. Deves R., Boyd C.A. Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function // *Physiol. Rev.* 1998. Vol. 78. P. 487–545.

108. Deves R., Chavez P., Boyd C.A. Identification of a new transport system (y⁺L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity // *J. Physiol. (London).* 1992. Vol. 454. P. 491–501.

109. Dimethylarginine levels and nutritional status in hemodialysis patients / Cupisti A., Saba A., D'Alessandro C. et al. // *J. Nephrol.* 2009. Vol. 22, N 5. P. 623-629.
110. Dombkowski R. A., Russell M. J., Olson K. R. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. Vol. 286, N 4. R678-685.
111. Eberhardt W., Pfeilschifter J. Nitric oxide and vascular remodeling: Spotlight on the kidney // *Kidney Int.* 2007. Vol. 72. P. 9–16.
112. Effect of a single hemodialysis session on endothelial dysfunction / Errakonda P.R., Paladugu R., Bitla A.R. et al. // *J. Nephrol.* 2011. Vol. 24, N 1. P. 83-90.
113. Effect of sympathetic and plasma renin activity on hemodialysis hypertension / Grekas D., Kalevosoglou I., Karamouzis M. et al. // *Clin. Nephrol.* 2001. Vol. 55, N 2. P. 115–120.
114. Effects of lipoprotein-associated phospholipase A2 on arginase/nitric oxide pathway in hemodialysis patients / Tektaş A.K., Uslu S., Yalçın A.U. et al. // *Ren. Fail.* 2012. Vol. 34, N 6. P. 738-743.
115. Effects of nutritional status on the L-arginine–nitric oxide pathway in platelets from hemodialysis patients / Clarissa Demézio da Silva, Tatiana M.C. Brunini, Patrícia F. Reis et al. // *Kidney International.* 2005. Vol. 68. P. 2173–2179.
116. Effects of nutritional status on the L-arginine-nitric oxide pathway in platelets from hemodialysis patients / da Silva C.D., Brunini T.M., Reis P.F. et al. // *Kidney Int.* 2005. Vol. 68, N 5. P. 2173-2179.
117. El Mashad G. M., ElSayed H. M., Nosair N. A. Effect of vitamin C supplementation on lipid profile, serum uric acid, and ascorbic acid in children on hemodialysis // *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 2016. Vol. 27, N 6. P. 1148-1154.

118. Elias A.N., Vaziri N.D., Maksy M. Plasma norepinephrine, epinephrine, and dopamine levels in end-stage renal disease. Effect of hemodialysis // Arch. Intern. Med. 1985. Vol. 145, N 6. P. 1013–1015.
119. Elmarakby A.A., Sullivan J.C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy // Cardiovasc. Ther. 2012. Vol. 30, N 1. P. 49-59.
120. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle? / Stenvinkel P., Carrero J.J., Axelsson J. et al. // Clin. J. Amer. Soc. Nephrol. 2008. Vol. 3, N 2. P. 505-521.
121. Endothelial dysfunction and nonalcoholic liver steatosis in hypertensive patients / Sciacqua A., M. Perticone, S. Miceli et al. // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 2011. Vol. 21, N 7. P. 485-491.
122. Enhanced nitric oxide synthesis in uremia: Implications for platelet dysfunction and dialysis hypotension / Noris M., Benigni A., Boccardo P. et al. // Kidney Int. 1993. Vol. 44. P. 445–450.
123. Enhanced production of nitric oxide may be involved in acute hypotension during maintenance hemodialysis / Nishimura M., Takahashi H., Maruyama K. et al. // Amer. J. Kidney Dis. 1998. Vol. 31. P. 809–817.
124. Estimation of hydrogen sulphide in the human lymphocytes / Barathi S., Vadhana P. et al. // Indian J Biochem Biophys. 2007. Vol. 44, № 3. P. 179-182.
125. Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages / Kashem A., Endoh M., Yano N. et al. // Kidney Int. 1996. Vol. 50, № 2. P. 392-399.
126. Feliers D., Lee H.J., Kasinath B.S. Hydrogen Sulfide in Renal Physiology and Disease// Antioxid Redox Signal. 2016. Vol. 25, N 13. P. 720-731.

127. Fliser D. Perspectives in renal disease progression: the endothelium as a treatment target in chronic kidney disease // *J. Nephrol.* 2010. Vol. 23, № 4. P. 369–376.
128. Forbes J. M., Coughlan M. T., Cooper M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes // *Diabetes.* 2008. Vol. 57, N 6. P. 1446-1454.
129. Forstermann U., Munzel T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace // *Circulation.* 2006. Vol. 113. P. 1708–1714.
130. Georgianos P.I., Sarafidis P.A., Zoccali C. Intradialysis Hypertension in End-Stage Renal Disease Patients: Clinical Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment // *Hypertension.* 2015. Vol. 66, N 3. P. 456–463.
131. Geyer J W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // *Anal. Biochem.* 1971. Vol. 39, № 2. P. 412-417.
132. Gill P.S., Wilcox C.S. NADPH oxidases in the kidney // *Antioxid Redox Signal.* 2006. Vol. 8, N 9-10. P. 1597-1607.
133. Green L.C., David A.W. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* 1982. Vol. 126. P.131–138.
134. Gross S.S. Nitric oxide synthases and their cofactors, Nitric oxide and the kidney: physiology and pathophysiology ; ed. Goligorsky M.S., Gross S.S. – New York : Chapman and Hall, 1997. P. 52–65.
135. Guo W., Cheng Z.Y., Zhu Y.Z. Hydrogen sulfide and translational medicine// *Acta Pharmacol Sin.* 2013. Vol. 34, N 10. P. 1284-1291.
136. Handelman G. J. Newer strategies for anemia prevention in hemodialysis // *Int. J. Artif. Organs.* 2007. Vol. 30, N 11. P. 1014-1019.
137. Himmelfarb J. Linking oxidative stress and inflammation in kidney disease: which is the chicken and which is the egg?// *Semin Dial.* 2004. Vol. 17, N 6. P. 449-454.
138. Hon W.M., Lee J.C., Lee K.H. Effect of hemodialysis on plasma nitric oxide levels // *Artif. Organs.* 2000. Vol. 24. P. 387–390.

139. Human uremic plasma and not urea induces exuberant secretion of leptin in 3T3-L1 adipocytes / Kalbacher E., Koppe L., Zarrouki B. et al. // *J. Ren. Nutr.* 2011. Vol. 21. P. 72–75.

140. Hydrogen sulfide is an endogenous potentiator of T cell activation / Miller T.W., Wang E.A., Gould S. [et al.] // *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287, № 6. P. 4211-4221.

141. Hydrogen sulfide, the third gaseous signaling molecule with cardiovascular properties, is decreased in hemodialysis patients / Perna A.F., Luciano M.G., Ingrosso D. et al. // *J. Ren. Nutr.* 2010. Vol. 20 (5 Suppl). P. 11-14.

142. Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role / Zaichko N.V., Melnik A.V., Yoltukhivskyy M.M. et al. // *Ukr. Biochem. J.* 2014. Vol. 86, № 5. P. 5-25.

143. Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets / Mehta J. L., Chen L. Y., Kone B. C. et al. // *J. Lab. Clin. Med.* 1995. Vol. 125. P. 370–377.

144. Identification of system y⁺ L as the high affinity transporter for L-arginine in human platelets: up-regulation of L-arginine influx in uremia / Mendes Ribeiro A.C., Brunini T.M. C., Yaqoob M. et al. // *Europ. J. Physiol.* 1999. Vol. 438. P. 573–575.

145. Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure / Hanssen H., Brunini T.M.C., Conway M. et al. // *Clin. Sci.* 1998. Vol. 94. P. 43–48.(117)

146. Increased nitric oxide production in hypotensive hemodialysis patients / Lin S.H., Chu P., Yu F.C. et al. // *ASAIO J.* 1996. Vol. 42. P.M895–M899.

147. Increased nitric oxide synthesis in uremic platelets is dependent on L-arginine transport via system y(+) L./ Brunini T.M.C., Yaqoob M., Novaes Malagris L. E. et al. // *Pflugers. Arch.* 2003. Vol. 445. P. 547–550.

148. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease / Oberg B.P., McMenamin E., Lucas F.L. et al. // *Kidney Int.* 2004. Vol. 65, N 3. P. 1009–1016.

149. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase / Dixon L.J., Hughes S.M., Rooney K. et al. // *Amer. J. Hypertens.* 2005. Vol. 18, № 6. P. 839–843.

150. Indices of activity of the nitric oxide system in hemodialysis patients / Schmidt R.J., Domico J., Samsell L.S. et al. // *Amer. J. Kidney Dis.* 1999. Vol. 34. P. 228–234.

151. Inducible NO synthase (iNOS) in human neutrophils but not pulmonary microvascular endothelial cells (PMVEC) mediates septic protein leak in vitro / Shelton J.L., Wang L., Cepinskas G. et al. // *Microvasc. Res.* 2007. Vol. 74, № 1. P. 23–31.

152. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients / Zimmermann J., Herrlinger S., Pruy A. et al. // *Kidney Int.* 1999. Vol. 55, N 2. P. 648-658.

153. Influence of Inflammation on Total Energy Expenditure in Hemodialysis Patients / Mafra D., Deleaval P., Teta D. et al. // *J. Ren. Nutr.* 2011. Vol. 21. P. 72–75.

154. Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O_2^- -mediated mitochondrial outgrowth / Werner J.H., Koopman S.F., Visch H. J. et al. // *Amer. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005. Vol. 288. P. 1440–1450.

155. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease? / Gocmen A.Y., Sahin E., Semiz E. et al. // *Canad. J. Cardiol.* 2008. Vol. 24. P. 209–212.

156. Ivanocko R.B., Sklyarov O.Ya., Hutnyk I.N. The changes of indices of L-arginine/nitric oxide/arginase system and oxidative processes in blood plasma in

patients with diabetic nephropathy before and after hemodialysis // *Sciences of Europe*. 2016. N 3. P. 12–15.

157. Ivanocko R.R., Biletska L., Sklyarov A. The content of L-arginine, Vitamin C and arginase activity in blood plasma and lymphocytes lysate in patients with chronic kidney disease before and after hemodialysis // 7th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, 23-24 May, 2013, Lviv, Ukraine. 2013. P. 59.

158. Jacobs P., Glorieux G., Vanholder R. Interleukin/cytokine profiles in hemodialysis and in continuous peritoneal dialysis // *Nephrol. Dial. Transplant*. 2004. Vol. 19. V41–V45.

159. Kavanaugh M.P. Voltage dependence of facilitated arginine flux mediated by the system y^+ basic amino acid transporter // *Biochemistry*. 1993. Vol. 32. P. 5781–5785.

160. Kim-Shapiro D.B., Schechter A.N., Gladwin M.T. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics // *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol*. 2006. Vol. 26, № 4. P. 697–705.

161. Klahr S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression // *Nephrol. Dial. Transplant*. 2001. Vol. 16. P. 60–62.

162. Klahr S., Morrissey J. L-arginine as a therapeutic tool in kidney disease // *Semin Nephrol*. 2004. Vol. 24. P. 389–394.

163. Kou R., Michel T. Epinephrine regulation of the endothelial nitric-oxide synthase: roles of RAC1 and beta3-adrenergic receptors in endothelial NO signaling // *J. Biol. Chem*. 2007. Vol. 282, № 45. P. 32719-32729.

164. L-arginine availability as a pathological mechanism in essential hypertension, chronic renal and heart failure / Brunini T.M.C., Resende A.C., Moss M.B. et al. // *Vasc. Dis. Prev*. 2005. Vol. 2. P. 37–51.

165. L-Arginine Transport and Nitric Oxide Production in Kinin Receptor B1-/- Endothelial Cells / Tudela R.C., Loiola R.A., Torres T.C. et al. // *Protein Pept Lett.* 2015. Vol. 22, N 12. P. 1111-1116.

166. L-arginine: a new opportunity in the management of clinical derangements in dialysis patients / Bellinghieri G., Santoro D., Mallamace A. et al. // *J. Ren. Nutr.* 2006. Vol. 16, № 3. P. 245–247.

167. Lee D.M., Jackson K.W, Knowlton N. Oxidative stress and inflammation in renal patients and healthy subjects // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, N 7. P. e22360.

168. Levels of arginine and its products in dialysis patients / Ugurcu V., Vatansev H., Unlu A. et al. // *Europ. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2014. Vol. 18, N 16. P. 2357-2364.

169. Low levels of vitamin C in dialysis patients is associated with decreased prealbumin and increased C-reactive protein / Zhang K., Liu L., Cheng X. et al. // *BMC Nephrol.* 2011. Vol. 6. P. 12-18.

170. Low total vitamin C plasma level is a risk factor for cardiovascular morbidity and mortality in hemodialysis patients/ Deicher R., Ziai F., Bieglmayer C. et al. // *J. Amer. Soc. Nephrol.* 2005. Vol. 16, N 6. P. 1811-1818.

171. Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells/ Jia S.J., Jiang D.J., Hu C.P. et al. // *Vascul. Pharmacol.* 2006. Vol. 44, N 3. P. 143-148.

172. Meenakshi S.R., Agarwal R. Nitric oxide levels in patients with chronic renal disease // *J. Clin. Diagn. Res.* 2013. Vol. 7, N 7. P. 1288-1290.

173. Mendes Ribeiro A.C., Brunini T.M. L-arginine transport in disease // *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* 2004. Vol. 2. P. 123–131.

174. Mendes-Ribeiro A.C., Brunini T.M.C., Ellory J.C. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure // *Cardiovasc. Res.* 2001. Vol. 49. P. 697–712.

175. Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study / Wennmalm A., Benthin G., Edlund A. et al. // *Circ. Res.* 1993. Vol. 73. P. 1121–1127.

176. Mishell B. B., Shiigi S. M. *Selected Methods in Cellular Immunology*. W.H. Freeman and Company, San Francisco. 1980. 486 p.

177. Mobilized human hematopoietic stem/progenitor cells promote kidney repair after ischemia/reperfusion injury / Li B., Cohen A., Hudson T. E. et al. // *Circulation*. 2010. Vol. 121, № 20. P. 2211–2220.

178. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters / Palacin M., Estevez R. et al. // *Physiol. Rev.* 1998. Vol. 78. P. 969–1054.

179. Montezano A. C., Touyez R. M. Molecular mechanisms of hypertension: reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician // *Can. J. Cardiol.* 2011. Vol. 28. P. 288–295.

180. Morris S.M. Enzymes of arginine metabolism // *J. Nutr.* 2004. Vol. 134, suppl. 10. P. 2743S–2747S.

181. Morris S.M. Arginases and arginine deficiency syndromes // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2012. Vol. 15, № 1. P. 64–70.

182. Morris S.M. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases // *Brit. J. Pharmacol.* 2009. Vol. 157, № 6. P. 922–930.

183. Mount P.F., Power D. A. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis // *Acta Physiol. (Oxf)*. 2006. Vol. 187, № 4. P. 433–446.

184. Nakagawa T. A new mouse model resembling human diabetic nephropathy: uncoupling of VEGF with eNOS as a novel pathogenic mechanism // *Clin. Nephrol.* 2009. Vol. 71, N 2. P. 103–109.

185. Nakamura T., Obata J., Kimura H. Blocking angiotensin II ameliorates proteinuria and glomerular lesions in progressive mesangioproliferative glomerulonephritis // *Kidney Int.* 1999. Vol. 55, N 3. P. 877–889.

186. Napoli C., Ignarro L. J. Nitric oxide and atherosclerosis // Nitric Oxide. 2001. Vol. 5. P. 88–97.
187. NG, NG-dimethylarginine and NG, NG-dimethylarginine in renal insufficiency / Al Banchaabouchi M., Marescau B., Possemiers I. et al. // Pflugers. Arch. 2000. Vol. 439. P. 524–531.
188. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein–Barr virus reactivation / Mannick J. B., Asano K., Izumi K. et al. // Cell. 1994. Vol. 79. P. 1137–1146.
189. Nitric oxide production in patients with chronic renal failure / Blum M., Yachnin T., Wollman Y. et al. // Nephron. 1998. Vol. 79. P. 265–280.
190. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues / Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 7797–7801.
191. Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes / Miles A. M., Owens M. W., Milligan S. et al. // J. Leuk. Biol. 1995. Vol. 58. P. 616–622.
192. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages / Reiling N., Ulmer A. J., Duchrow M. et al. // Europ. J. Immunol. 1994. Vol. 24. P. 1941–1944.
193. Nitric oxide synthesis requires activity of the cationic and neutral amino acid transport system $y^+ L$ in human umbilical vein endothelium / Arancibia-Garavilla Y., Toledo F., Casanello P. et al. // Exp. Physiol. 2003. Vol. 88. P. 699–710.
194. Nitric oxide, malnutrition and chronic renal failure / Brunini T.M., Moss M.B., Siqueira M.A. et al. // Cardiovasc. Hematol. Agents. Med. Chem. 2007. Vol. 5, № 2. P. 155–161.
195. Nox4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and

fibronectin expression / Block K., Eid A., Griendling K. K. et al. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 35. P. 24061-24076.

196. Odenlund M., Holmqvist B., Baldetorp B. Polyamine synthesis inhibition induces S phase cell cycle arrest in vascular smooth muscle cells // *Amino Acids*. 2009. Vol. 36, № 2. P. 273–282.

197. Olson K. R. Mitochondrial adaptations to utilize hydrogen sulfide for energy and signaling // *J. Comp. Physiol. B*. 2012. Vol. 182. P. 881–897.

198. Orlando G., Wolf G., Engelmann M. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice // *Amino Acids*. 2008. Vol. 35. P. 17–27.

199. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options / Kao M. P., Ang D. S. et al. // *J. Hum. Hypertens*. 2010. Vol. 24, N 1. P. 1-8.

200. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease / Small D. M., Coombes J. S., Bennett N. et al. // *Nephrology (Carlton)*. 2012. Vol. 17, N 4. P. 311–321.

201. Ozbek E. Induction of oxidative stress in kidney // *Int. J. Nephrol*. 2012. Vol. 2012. ID : 465897.

202. Pacher P., Beckman J. S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // *Physiol. Rev*. 2007. Vol. 87, № 1. P. 315–424.

203. Palm F., Teerlink T., Hansell P. Nitric oxide and kidney oxygenation // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens*. 2009. Vol. 8, № 1. P. 68–73.

204. Pawloski J.R., Swaminathan R.V., Stamler J.S. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation // *Circulation*. 1998. Vol. 97. P. 263–267.

205. PDE5 inhibitors as therapeutics for heart disease, diabetes and cancer / Das A., Durrant D., Salloum F.N. et al. // *Pharmacol Ther*. 2015. Vol. 147. P. 12–21.

206. Peripheral mononuclear cells from uraemic patients exhibit an increased transport of L-arginine via system $\gamma^+(\text{cat-1})$: implications for nitric oxide synthesis / Mendes Ribeiro A.C., Brunini T.M.C., Yaqoob M. et al. // *J. Physiol. (London)*. 1998. Vol. 506. P. 30-37.

207. Physiological Importance of Hydrogen Sulfide: Emerging Potent Neuroprotector and Neuromodulator / Panthi S., Chung H.J. et al. // *Oxid. Med. Cell Longev*. 2016. 9049782.

208. Plasma amino acid profile and L-arginine uptake in red blood cells from malnourished uremic patients / Reis P. F., da Silva C. D., Brunini T. M. et al. // *J. Ren. Nutr*. 2006. Vol. 16, № 4. P. 325–331.

209. Plasma and erythrocyte relationship of catecholamines in haemodialysis patients / Dziedzic M., Bednarek-Skublewska A. et al. // *Ann. Agr. Env. Med*. 2014. Vol. 21, N 3. P. 565–566.

210. Plasma levels of catecholamines and asymmetric dimethylarginine levels as predictive values of mortality among hemodialysis patients / Dziedzic M., Orłowska E., Gawęł K. et al. // *Curr. Issues Pharm. Med. Sci*. 2014. Vol. 27, N 1. P. 37-40.

211. Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction / Heiss Ch., Lauer T., Dejam A. et al. // *J. Amer. Coll. Cardiol*. 2006. Vol. 47, № 3. P. 573–579.

212. Plasma Norepinephrine Predicts Survival and Incident Cardiovascular Events in Patients With End-Stage Renal Disease / Zoccali C., Mallamaci F., S. Parlongo et al. // *Circulation*. 2002. Vol. 105, N 11. P. 1354–1359.

213. Protein determination with the Folin phenol reagent / Lowry O. H., Rosenbrough N. J. et al. // *J. Biol. Chem*. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

214. Puzserova A., Bernatova I. Blood pressure regulation in stress: focus on nitric oxide-dependent mechanisms // *Physiol Res*. 2016. Vol. 65 (Suppl. 3). P. S309-S342.

215. Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. P. 5193–5197.

216. Raij L. The pathophysiologic basis for blocking the renin-angiotensin system in hypertensive patients with renal disease // *Amer. J. Hypertens*. 2005. Vol. 4, № 2. P. 95–99.

217. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of arginine supplementation in chronic renal failure / De Nicola L., Bellizzi V., Minutolo R. et al. // *Kidney Int*. 1999. Vol. 56. P. 674–684.

218. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF- γ , TGF- β and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages / Chesrown S. E., Monnier J. et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1994. Vol. 200. P. 126–134.

219. Regulation of L-arginine transport and nitric oxide release in superfused porcine aortic endothelial cells / Bogle R.G., Baydoun A.R. et al. // *J. Physiol. (London)*. 1996. Vol. 490. P. 229–241.

220. Regulation of nitric oxide synthesis in uraemia / Arese M., Strasly M., Ruva C. et al. // *Nephrol. Dial. Transplant*. 1995. Vol. 10. P. 1386–1397.

221. Regulatory mechanisms underlying agmatine homeostasis in humans / Haenisch B., von Kiigelgen I., Bonisch H. et al. // *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol*. 2008. Vol. 295, № 5. P. G1104–G1110.

222. Reyes A.A., Karl I.E., Klahr S. Role of L-arginine in health and renal disease // *Amer. J. Physiol*. 1994. Vol. 267. P. F331–F346.

223. Roberts C. K. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome // *Metabolism*. 2006. Vol. 55. P. 928–934.

224. Role of Oxidative Stress and Inflammatory Factors in Diabetic Kidney Disease/ Aghadavod E., Khodadadi S., Baradaran A. et al. // *Iran. J. Kidney Dis.* 2016. Vol. 10, N 6. P. 337-343.
225. Roman L.J., Masters B.S.S. Electron Transfer by Neuronal Nitric-oxide Synthase Is Regulated by Concerted Interaction of Calmodulin and Two Intrinsic Regulatory Elements // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 32. P. 23111–23118.
226. Saikat Sen, Raja Chakraborty The Role of Antioxidants in Human Health // In *Oxidative Stress: Diagnostics, Prevention, and Therapy*. ACS Symposium Series. American Chemical Society : Washington, 2011.
227. Sarkar S. R., Kaitwatcharachai C., Levin, N. W. Nitric oxide and hemodialysis // *Semin. Dial.* 2004. Vol. 17. P. 224–228.
228. Schalkwijk C.G., Stehouwer C.D. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction// *Clin. Sci. (London)*. 2005. Vol. 109, N 2. P. 143-159.
229. Schnabel R., Blankenberg S., Lubos E. Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study // *Circ. Res.* 2005. Vol. 97, N 5. P. e53–59.
230. Schwedhelm E., Böger R. H. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease// *Nat Rev Nephrol.* 2011. Vol. 7, N 5. P. 275-285.
231. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases / Fleck C., Schweitzer F., Karge E. et al. // *Clin. Chim. Acta.* 2003. Vol. 336, N 1-2. P. 1-12.
232. Short daily versus conventional hemodialysis for hypertensive patients: a randomized cross-over study / Zimmerman D.L., Ruzicka M., Hebert P. et al. // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, N 5. e97135.

233. Sitmo M., Rehn M., Diener M. Stimulation of voltage-dependent Ca^{2+} channels by NO at rat myenteric neurons // Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2007. Vol. 293, № 4. P. 886–893.

234. Szabo C. Hydrogen sulfide, an enhancer of vascular nitric oxide signaling: mechanisms and implications // Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 2017. Vol. 312, № 1. C.3-15.

235. Sztanek F., Molnárné Molnár Á., Balogh Z. The role of oxidative stress in the development of diabetic neuropathy// Orv Hetil. 2016. Vol.157, N 49. P. 1939-1946.

236. The Cardioprotective Effects of Hydrogen Sulfide in Heart Diseases: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Potential / Shen Y., Shen Z. et al. // Oxid Med Cell Longev. 2015. 2015. 925167.

237. The effect of renin-angiotensin system inhibitors on mortality and heart failure hospitalization in patients with heart failure and preserved ejection fraction: a systematic review and meta-analysis / Shah R.V., Desai A.S., Givertz M.M. et al. // J. Card. Fail. 2010. Vol. 16, № 3. P. 260–267.

238. The transporter and permeability interactions of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine with the human blood-brain barrier in vitro/ Watson C.P., Pazarentzos E., Fidanboyly M. et al. // Brain Res. 2016. Vol. 1648, Pt A. P. 232-242.

239. Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure / Mendes Ribeiro A.C., Hanssen H., Kiessling K. et al. // Clin. Sci. 1997. Vol. 93. P. 57–64.

240. Uremic malnutrition is a predictor of death independent of inflammatory status / Pupim L.B., Caglar K., Hakim R.M. et al. // Kidney Int. 2004. Vol. 66. P. 2054–2060.

241. Vallance P., Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine: dimethylarginine dimethyl-aminohydrolase pathway // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004. Vol. 24. P. 1023–1030.

242. Wallace J.L. Physiological and pathophysiological roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. Vol. 12, N 9. P. 1125-1133.

243. Weinberg J.B. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review // *Mol. Med.* 1998. Vol. 4, N 9. P. 557-591.

244. Wu N., Su R. B., Li J. Agmatine and imidazoline receptors: their role in opioid analgesia, tolerance and dependence // *Cell Mol. Neurobiol.* 2008. Vol. 28, N 5. P. 629-641.

245. Zhou T.B., Yin S.S. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism with the risk of end-stage renal disease // *Ren. Fail.* 2013. Vol. 35, N 4. P. 573-578.

246. Zoccali C. The endothelium as a target in renal diseases // *J. Nephrol.* 2007. Vol. 20, suppl. 12. P. 39–44.

247. Zucker I.H., Patel K.P., Schultz H.D. Neurohumoral stimulation // *Heart Fail. Clin.* 2012. Vol. 8, № 1. P. 87–99.

ДОДАТКИ
ДОДАТОК А





ЗАТВЕРДЖУЮ»

Керівник проєкту

ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія»

проф. Бобирьов В.М.

20 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріали дисертаційної роботи до навчального процесу

1. Назва пропозиції для впровадження: Роль системи L-аргінін/NO-синтази/аргіназа та оксидативних процесів у хворих з хронічною нирковою недостатністю за умов діалізу

2. Заклад, де проведена розробка, адреса, ПІБ авторів: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. Здобувач наукового ступеня – Іваночко Руслана Богданівна.

3. Джерела інформації: 1. Зміни показників системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу./Р.Б.Іваночко, Л.П. Білецька О.Я.Склярів //Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2014. – № 1. – С. 66-71.

2. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу/Р.Б. Іваночко, О.Я. Склярів.// Медична хімія. – 2014. – № 2. – С.26-30.

4. Впроваджено: на кафедрі медичної, біоорганічної та біологічної хімії ДВНЗ «Українська медична стоматологічна академія», Полтава.

5. Включено: в лекційний курс і практичні заняття з біологічної хімії.

Результати впровадження: у лекцію та практичні заняття по темі “Біохімія видільної системи” для студентів II курсу медичного та стоматологічного факультетів впроваджено дані щодо ролі системи L-аргенін/NO-синтази/аргіназа та оксидативних процесів у хворих з хронічною нирковою недостатністю за умов діалізу.

6. Термін впровадження: 2015 рік.

7. Базова установа, яка здійснює впровадження: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького.

8. Зауваження і пропозиції: не вносилися.

Протокол №11 від 22.04.2015р.

Відповідальний за впровадження
завідувач кафедри медичної, біоорганічної та біологічної хімії
ВДНЗ «Українська медична стоматологічна академія»,
доктор медичних наук, професор

К.С. Непорада



«ЗАТВЕРДЖУЮ»



в.о. ректора Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького
член-кореспондент НАМН України,

проф. М. Р. Гжегоцький

2017 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

результатів дисертаційної роботи

здобувача Іваночко Руслани Богданівни

«Роль системи L-аргініну /NO-синтаз/аргінази та оксидативних процесів
за умов гемодіалізу»

Ми, що нижче підписалися, члени комісії: завідувач кафедри біологічної хімії д.мед.н., проф. Склярів О.Я., д.біол.н., в.о. проф. Фоменко І.С., к.біол.н., доц. Хаврона О.П. склали даний акт про те, що на кафедрі біологічної хімії у 2016-2017 роках були впроваджені в навчальний процес дані дисертаційної роботи здобувача Іваночко Руслани Богданівни.

У курс лекцій з біохімії для студентів II курсу медичного факультету впроваджено дані про зміни нітрузо-оксидативних процесів у крові та лімфоцитах за умов хронічної хвороби нирок.

Джерело інформації:

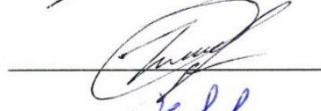
1. Іваночко Р.Б. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з діабетичною нефропатією до та після сеансу гемодіалізу. Український журнал нефрології та діалізу. 2015. № 3. С. 53–57.
2. Вплив гемодіалізу на рівень катехоламінів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю / Р. Іваночко, М. Дзідзік, Я. Сольські, О. Склярів // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2016. № 1. С. 67–74.

Голова комісії



д.мед.н., проф. Склярів О.Я.

Члени комісії



д.біол.н., в.о. проф. Фоменко І.С.



к.біол.н., доц. Хаврона О.П.

« 11 » 10 2017 р.

ДОДАТОК В

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Іваночко Р. Б., Білецька Л. П., Склярів О. Я. Зміни показників системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2014. № 1. С. 66-71 (Дисертантка проаналізувала літературу, провела визначення біохімічних показників, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, статистично опрацювала, підготувала публікацію до друку).

2. Іваночко Р. Б., Склярів О. Я. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // Медична біохімія. 2014. № 2. С. 26-30 (Дисертантка провела визначення біохімічних показників, проаналізувала та узагальнення одержаних результатів, статистично опрацювала, підготувала публікацію до друку).

3. Іваночко Р. Б. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з діабетичною нефропатією до та після сеансу гемодіалізу // Український журнал нефрології та діалізу. 2015. № 3. С. 53-57.

4. Іваночко Р., Дзідзік М., Сольські Я., Склярів О. Вплив гемодіалізу на рівень катехоламінів у плазмі крові хворих з хронічною нирковою недостатністю // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2016. № 1. С. 67-74 (Дисертантка проаналізувала літературу, взяла участь у аналізі результатів дослідження катехоламінів, підготувала публікацію до друку).

5. Ivanocko R. B., Sklyarov O. Ya., Hutnyk I.N. The changes of indices of L-arginine/nitricoxide/arginase system and oxidative processes in blood plasma in patients with diabetic nephropathy before and after hemodialysis// Sciences of Europe. 2016. N3. P. 12-15 (Дисертантка провела визначення біохімічних

показників, статистично опрацювала результати, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготувала публікацію до друку).

6. Іваночко Р. Б. Пат. № 110109 України, МПК G01N 33/48 (2006.01). Спосіб прогнозування стану хворих з діабетичною нефропатією за умов гемодіалізу; патентовласник Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького. – №u201603129; заявл. 23.05.2016, опубл. 26.09.2016, Бюл. № 18.

7. Ivanocko R.R., Biletska L., Sklyarov A. The content of L-arginine, Vitamin C and arginase activity in blood plasma and lymphocytes lysate in patients with chronic kidney disease before and after hemodialysis // 7th Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, 23-24 May, 2013, Lviv, Ukraine. 2013. P. 59. (Дисертантка проаналізувала літературу, визначила вміст L-аргініну, вітаміну С, активність аргінази, статистично опрацювала результати, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготувала публікацію до друку).

8. Іваночко Р. Б., Склярів О. Я. Зміни концентрації L-аргініну, нітрогену оксиду та активності аргінази у плазмі крові та лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // The Ukrainian Biochemical Journal. 2014. Vol. 86, N 5, suppl. 2. С. 75–76 (Матеріали XI Українського біохімічного конгресу, 6-10 жовтня 2014 р., м. Київ) (Дисертантка проаналізувала літературу, провела біохімічні дослідження, опрацювала результати, виконала аналіз та узагальнення одержаних результатів, підготувала публікацію до друку).

9. Іваночко Р. Б. Вплив сеансу гемодіалізу на систему NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах у хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу // Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2015: тези доп. конференції-конкурсу молодих учених (м. Київ, 23-24 квітня 2015 р.). К., 2015. С. 29.

10. Іваночко Р. Б. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах хворих, які отримують замісну ниркову терапію // Третя міжнар. наукова конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії

та клітинної біології», м. Дніпропетровськ, 24-25 вересня 2015 р.
Дніпропетровськ : Арбуз, 2015. С. 122-123.

ДОДАТОК Г
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 7-а Львівсько-Люблінська конференція (Львів, 2013) – стендова доповідь;
2. З'їзд Українського Біохімічного Товариства (Київ, 2014) – усна доповідь і публікація;
3. Конференція молодих учених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24.04.2015 р.) – усна доповідь і публікація;
4. Третя міжнародна наукова конференція «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (Дніпропетровськ, 24-25.09.2015 р.) – усна доповідь і публікація;
5. Науко-практична конференція «Нефрологія і діаліз: up to date» (Чернівці, 8-9.10.2015 р.) – участь у конференції, публікація.