

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

ІВАНОЧКО РУСЛАНА БОГДАНІВНА

УДК:616.61-008.64-036.12-085.386-092

**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

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Вінниця – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького МОЗ України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Склярів Олександр Якович,
Львівський національний медичний університет
імені Данила Галицького МОЗ України,
завідувач кафедри біологічної хімії.

Офіційні опоненти:

- доктор медичних наук, професор **Волощук Наталія Іванівна**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, завідувач кафедри фармакології;
- доктор медичних наук, старший науковий співробітник **Новікова Світлана Миколаївна**, Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», м. Київ, заступник директора з наукової роботи.

Захист відбудеться «27» червня 2018 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 05.600.05 у Вінницькому національному медичному університеті імені М. І. Пирогова МОЗ України (21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Автореферат розісланий «_____» _____ 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

О. А. Назарчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 (Топчий И. И. та ін., 2012; Lee D. M. et al, 2011; Kao M. P. et al., 2010; Del Vecchio L. et al., 2011). 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 (Smalletal D.M., 2012; Zhou T.B., Yin S.S., 2013; Sztanek F. et al, 2016).

Уремія є провідним чинником, що викликає зміни активності NO-синтази ендотеліоцитів судин та клітин паренхіми нирок і, у подальшому, зумовлює розвиток патологічних змін у серцево-судинній системі хворих з ХНН (Гоженко А. І. та ін., 2013; Meenakshi S.R., 2013; Korol L.V. et al., 2017). 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 (De Jager D. J. et al., 2009; Schwedhelm E., 2011; Voelaert J. et al., 2016).

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 (Filipovic M.R. et al., 2012; Zaichko N.V. et al., 2014), рівень якого знижується у пацієнтів з уремією (Wang W. et al., 2015). Катехоламіни, поряд із прямою вазорегулюючою дією, також опосередковано впливають на активність ендотеліальної NO-синтази (Kou R., Michel T., 2007; Moens A.L. et al., 2010).

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 індукцйбельної NO-синтази (Kashem A. et al., 1996; Bush M. et al., 2006; Bogdan C., 2011). Також лімфоцитарні клітини здатні до продукції гідроген сульфїду (Varathi S. et al., 2007; Miller T.W. et al., 2012). 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 (Степанова Н. М. та ін., 2012; Колесник М. О., 2016).

Таким чином, оцінка змін рівнів вазоактивних регуляторів (NO, гідроген сульфїду, 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.01110U001641. 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, гідрогенсульфіду, 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 у сироватці крові та лізаті лімфоцитів у

хворих з ХНН7 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 нітрито-оксидативних 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 iNOS, зменшення активності eNOS та вмісту L-аргініну у порівнянні з контрольною групою. Сеанс гемодіалізу спричиняв значне зниження активності iNOS та eNOS, 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 сульфїду, вітаміну С і зростання рівнів норадреналїну, АДМА та СДМА у плазмі крові. Отримані результати є підґрунтям для оптимізації метаболїчної підтримки хворих на ХНН після сеансу гемодїалїзу шляхом фармакологїчної корекції рівнів L-аргініну та вітаміну С у перспективі.

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

Результати дисертації впроваджені у навчальний процес кафедр біохїмії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені Я.І. Горбачевського» МОЗ України, ВДНЗ України «Українська медична стоматологїчна академїя» МОЗ України, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України.

Особистий внесок здобувача. Автор виконав весь обсяг експериментальної частини роботи на базі кафедри біологїчної хїмії 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 здїйснено разом з науковим керівником д. мед. наук, проф. О.Я. Скляровим. Біохїмічні 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. Сольскі. 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 Біохїмічного Товариства (Київ, 2014); конференції молодих учених «Актуальні проблеми біохїмії та біотехнології-2015» (Київ, 23-24 квітня 2015); третій міжнародній науковій конференції «Актуальні проблеми сучасної біохїмії 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 зарубїжному 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 сторїнок основного змісту), складається зі вступу, огляду літератури, методик досліджень та загальної клінічної характеристики хворих, двох 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. Наведено сучасні дані щодо впливу сеансу гемодіалізу на систему L-аргінін/NO-синтази/аргіназа та оксидативних процесів у хворих з ХНН. Висвітлена роль катехоламінів (адреналіну, норадреналіну, дофаміну) у хворих з ХНН, які отримують замісну ниркову терапію методом гемодіалізу.

Матеріали та методи дослідження. Обстеження проводились на базі нефрологічного відділення Львівської обласної клінічної лікарні та на базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща). 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) та рекомендації KDOQI та KDIGO з діагностики та лікування хворих на ХНН (А. В. Смирнов, 2012). 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).

Всього було обстежено 99 хворих, з них пацієнтів з ХНН на ґрунті гломерулонефриту – 42, з цукровим діабетом 2-го типу – 20. У контрольну групу увійшла кров 20 донорів. Кров для дослідження у кожного хворого забирали з фістульної голки перед та після гемодіалізу (ГД). На базі діалізної станції «DIAVERUM» (Люблін, Польща) було обстежено 37 хворих.

До та після сеансу гемодіалізу у плазмі крові та лізаті лімфоцитів визначали процеси ліпопероксидації та показники антиоксидантного захисту: вміст ТБК-активних продуктів (Тимирбулатов М.А., Селезнев Е.И., 1981), окиснених ліпопротеїнів низької щільності (oxLDL) – використовуючи імуоферментний метод ELISA із застосуванням наборів реактивів фірми (Merckodia AB, Швеція). Активність мієлопероксидази (КФ 1.11.1.7) визначали за реакцією з о-діанізидином (Bradley P.P. et al., 1982), глутатіонпероксидази (ГПО; КФ 1.11.1.9) – за швидкістю окиснення глутатіону (Моин В.М., 1986), супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15.1.1) за реакцією з нітросинім тетразолієм (Чевари С. та ін., 1991), каталази (КФ 1.16.1.6) за реакцією перекису водню з молібдатом амонію (Корольок М. А. та ін., 1988), а також вміст загальної та окисненої форм вітаміну С (Шпаков А.Е., 1967). Вміст АДМА і СДМА визначали використовуючи імуоферментний метод ELISA за наборами DLD Diagnostica GmbH (Німеччина). Визначали

Для оцінки NO-синтазної системи визначали вміст L-аргініну за реакцією Сакагучі (Алейникова Т.Л., Рубцова Г. В., 1988), активність аргінази (КФ 3.5.3.1) – за кількістю утвореної сечовини (Geyer J.W., Dabick P., 1981), активність ізоформ NO-синтази (КФ 1.14.13.39) за визначенням NADPH (Сумбаєв В.В., Ясинська І. М., 2000). Вміст нітрит-аніону визначали за реакцією з реактивом Грися (Green L. С., 1982), суму $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ визначали з використанням суміші цинкового пилу та мангану сульфату (для відновлення нітрату до нітриту) або мангану сульфату (при визначенні нітрит-аніону) (Кіселик І.О., 2001). Вміст H_2S визначали за реакцією з N,N-диметил-р-фенілендіаміном в присутності FeCl_3 (Dombkowski R.A. et al., 2004).

Для екстракції катехоламінів (адреналіну, норадреналіну, дофаміну) були використані набори фірми ChromSystem (Німеччина). Для досліджень була

застосована 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 колонці C18 (ChromSystem, Німеччина).

У плазмі крові визначали вміст білірубину, АсТ, АлТ, креатиніну, сечовини, формених елементів крові, гемоглобіну, іонів Na^+ та K^+ , ШОЕ загальноприйнятими методами у клінічній лабораторії КЗ ЛОР Львівська обласна клінічна лікарня.

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. За умов нормального розподілу використовували тест t-Стьюдента, у ряді випадків використовували непараметричні тести, для порівняння пов'язаних величин застосовували U-критерій Манн-Уїтні для двох величин. Виявлену різницю вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Роль системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа оксидативних процесів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу. У хворих з ХНН, що знаходяться на підтримуючому гемодіалізі, як у плазмі крові, так і лізаті лімфоцитів відзначено зниження концентрації L-аргініну (на 33%, $p < 0,01$ та 31%, $p < 0,01$, відповідно), порівняно з показниками групи донорів. Після проведення сеансу гемодіалізу концентрація L-аргініну у плазмі крові знизилась на 20%, у лізаті лімфоцитів на 30% ($p < 0,05$), у порівнянні з показниками до ГД. Тобто, сеанс ГД викликав значне зниження концентрації L-аргініну як у плазмі крові, так і лізаті лімфоцитів.

До ГД вміст NO_2^- як у плазмі крові, так і лізаті лімфоцитів мав тенденцію до зниження, сума нітратів та нітритів – вищою (у 2,2 рази та 14%, відповідно), ніж за умов контролю. Після ГД вміст NO_2^- достовірно ($p < 0,05$) зменшувався порівняно з показниками групи донорів. Слід відзначити, що у плазмі крові групи донорів вміст NO_2^- становив 26% суми $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, то у хворих на ХНН – 11%, що свідчить про зниження вмісту вазодилатативного NO_2^- та зростання нітрозильованих молекул. Сума нітрати+нітрити у лімфоцитах хворих на ХНН до ГД була дещо вищою, порівняно з показниками групи донорів, однак значно нижчою, ніж у плазмі крові – на 52% ($p < 0,05$), що вказує на зростання нітрозомісних продуктів у плазмі крові. У лізаті лімфоцитів, у порівнянні з плазмою крові хворих на ХНН, вміст нітрит-аніона був нижчим та його динаміка змін після ГД достовірно не відрізнялась від показників групи донорів. Однак, джерела NO у плазмі крові та лімфоцитах є різними – NO потрапляє у кров в основному з ендотеліоцитів, а у цитоплазмі лімфоцитів локалізується NO-синтаза, яка продукує нітроген оксид з L-аргініну.

До ГД концентрація H_2S у плазмі крові хворих з ХНН виражено зменшувалась – на 23% ($p < 0,01$), у лізаті лімфоцитів вміст H_2S суттєво не відрізнявся від показників групи донорів та його концентрації у плазмі крові. Після ГД його концентрація у плазмі крові знижувалася на 12% ($p < 0,05$), у лізаті лімфоцитів на 23% ($p < 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1 - Вміст у плазмі крові та лізаті лімфоцитів L-аргініну, нітрит-аніону, гідрогену сульфіді та суми нітратів і нітритів у хворих з ХНН до та після гемодіалізу (M±m)

Характеристика груп	L-аргінін мкг/мл	Нітрит-аніон мкмоль/л	NO ₂ ⁻ + NO ₃ ⁻ мкмоль/л	H ₂ S мкмоль/л
Плазма крові				
Контроль, n=20	93,3±16,9	0,83±0,07	3,2±0,58	86,6±7,2
Хворі на ХНН до ГД, n=42	62,3±12,1**	0,76 ±0,06	7,0±1,55**	66,5±5,4**
Хворі на ХНН після ГД, n=42	49,9±10,8 ^{##}	0,68±0,05*	5,3±1,16	54,4±3,7 [#]
Лізат лімфоцитів				
Контроль, n=20	35,5±3,8	0,7±0,05	2,9±0,3	69,6±3,5
Хворі на ХНН до ГД, n=42	24,6±3,2*	0,61±0,05	3,3±1,39	63,8±4,7
Хворі на ХНН після ГД, n=42	17,1±2,7 [#]	0,48±0,04 [#]	2,5±0,57	49,3±4,8 [#]

Примітка 1. * - достовірність змін відносно контролю (p<0,05); ** - p<0,01.

Примітка 2. [#] - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу (p<0,05); ^{##} - p<0,01.

У хворих з ХНН до гемодіалізу концентрація АДМА та СДМА у плазмі крові була значно більшою, ніж у крові донорів. Так, 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 донорів (табл. 2). Після гемодіалізу концентрації АДМА та СДМА у плазмі крові хворих з ХНН зменшились на 49% (p<0,05) та 48% (p<0,05), відповідно.

Таблиця 2 - Вміст у плазмі крові асиметричного та симетричного диметиларгініну у хворих з ХНН до та після гемодіалізу(M±m)

Характеристика груп	АДМА, ммоль/л	СДМА, ммоль/л
Плазма крові		
Контроль, n=20	0,78 ± 0,05	0,59 ± 0,04
Хворі на ХНН до ГД, n=42	1,8 ± 0,06**	2,0 ± 0,06**
Хворі на ХНН після ГД, n=42	0,92 ± 0,06 [#]	1,1 ± 0,06 [#]

Примітка 1. * - достовірність змін відносно контролю (p<0,05); ** - p<0,01.

Примітка 2. [#] - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу (p<0,05).

Значну роль у лімфоцитах відіграє рівень активності ізофом NO-синтази: у хворих з ХНН рівень активності iNOS зростала у 15 разів (p<0,01); рівень активності eNOS знижувалась на 70% (p<0,05) (табл. 3).

Після сеансу ГД слід відзначити різке, зниження рівня активності iNOS (у 14 разів, p<0,01) та активності eNOS (у 8 разів, p<0,01), що свідчить про вплив процедури ГД на активність лімфоцитарної NO-синтази.

Рівень активності аргінази у плазмі крові хворих на ХНН, порівняно з показниками групи донорів, був вищим на 33%, що вказує на підвищення рівня неокисного шляху обміну L-аргініну внаслідок чого зростає вміст орнітину та поліамінів. До ГД активність аргінази у лімфоцитах була невірогідно нижчою (на 14%, p>0,05), порівняно з показниками контрольної групи обстежених, після сеансу

ГД у активність аргінази мала тенденцію до зростання.

Таблиця 3 - Зміни активності у лізаті лімфоцитів NO-синтази та аргінази у хворих з ХНН до та після гемодіалізу (M±m)

Характеристика груп	iNOS нмоль/хв·мл	eNOS нмоль/хв·мл	Аргіназа мкмоль/хв·мл
Контроль, n=20	0,06±0,02	0,81±0,17	0,22±0,05
Хворі на ХНН до ГД, n=42	0,89±0,19**	0,24±0,08*	0,19±0,04
Хворі на ХНН після ГД, n=42	0,06±0,02 ^{##}	0,18±0,01**	0,23±0,03

Примітка 1. * - p<0,05, ** - p<0,01 відносно контрольних значень.

Примітка 2. # - p<0,05, ## - p<0,01 - відносно показників до гемодіалізу.

Вплив сеансу 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. Порушення функціонування симпатичного відділу вегетативної нервової системи у хворих ХНН обумовлено хронічним стресом, ендотеліальною дисфункцією, гіпертензією, зміною функцій тромбоцитів, підвищенням вмісту у крові маркерів запалення і окисного стресу (Дудар І.О., 2012; Dziedzic M., Bednarek-Skublewska A., 2014; Georgianos P.I., 2015). Між впливом стресу та NO-синтазної системи на різних регуляторних рівнях існують тісні взаємозв'язки (Puzserova A., Bernatova I., 2016).

Встановлено, що у пацієнтів з ХНН, яких лікували гемодіалізом, концентрація норадреналіну в плазмі крові була значно вищою (у 2,3 рази, p<0,01), ніж у обстежених контрольної групи. Концентрація адреналіну та дофаміну в плазмі хворих з ХНН статистично достовірно не відрізнялася від показників контрольної групи (табл. 4). Після застосування ГД у хворих ХНН відзначено зниження концентрації норадреналіну на 24% (p<0,01) в плазмі крові по відношенню до його вмісту перед процедурою. Порівнюючи концентрації інших катехоламінів у плазми не виявлено достовірної різниці між їх показниками до і після гемодіалізу. Не виявлено статистично достовірної різниці концентрації досліджуваних катехоламінів у жінок і чоловіків з ХНН порівняно з групою донорів.

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

Таким чином, у плазмі хворих на ХНН зростає вміст вазоконстрикторів (норадреналіна, асиметричного та симетричного диметиларгініна) та одночасно зменшується концентрація нітрит-аніону, L-аргініну та гідроген сульфіді, що може викликати розвиток артеріальної гіпертензії.

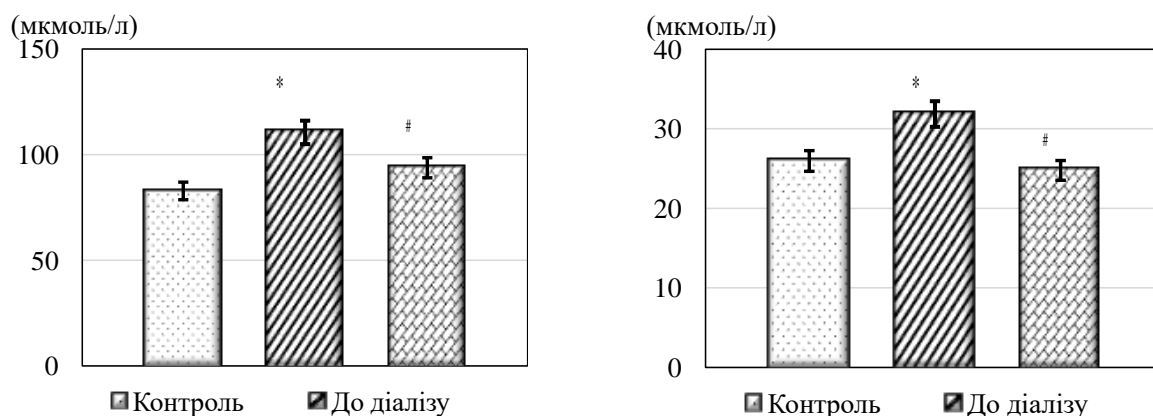
Таблиця 4 - Концентрація катехоламінів плазми до та після гемодіалізу у хворих з ХНН (M±m, Min-Max)

Характеристика груп	Норадреналін, пг/мл	Адреналін, пг/мл	Дофамін, пг/мл
Контроль, n=22	240,5 ± 42,5 (164,2 – 326,3)	46,8 ± 12,0 (31,9 – 69,5)	40,5 ± 8,9 (28,5 – 54,7)
Хворі на ХНН до ГД, n=37	763,9 ± 565,3** (71,2 – 2866,2)	83,1 ± 114,1 (13,1 – 689,9)	44,03 ± 23,9 (12,4 – 124,5)
Хворі на ХНН після ГД, n=37	552,8 ± 597,6 ^{##} (60,5 – 3657,4)	60,7 ± 73,7 (9,2 – 448,8)	45,2 ± 22,8 (10,64 – 95,5)

Примітка 1. * - p<0,05, ** - p<0,01 відносно контрольних значень.

Примітка 2. # - p<0,05, ## - p<0,01 - відносно показників до гемодіалізу.

Зміни процесів ліпопероксидації та стан системи антиоксидантного захисту в плазмі крові та лімфоцитах хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу. Відзначені наступні зміни оксидативних процесів та активності ензимів антиоксидантного захисту у плазмі крові та лізаті лімфоцитів у хворих на ХНН. Так, до ГД у плазмі крові вміст ТБК-активних продуктів був вищим на 34% (p<0,05) (рис. 1А), вміст охLDL та активність мієлопероксидази не змінювались. Після гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові зменшився на 14% (p<0,05), активність мієлопероксидази була нижче контрольних значень. Вміст окиснених ліпопротеїнів достовірно не змінювався, порівняно з показниками до гемодіалізу. Отже, сеанс гемодіалізу знижує вміст ТБК-активних продуктів та активність мієлопероксидази.



А

Б

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

Рисунок 1 - Концентрація ТБК активних продуктів у хворих з хронічною нирковою недостатністю у плазмі крові (А) та лізаті лімфоцитів (Б) до та після гемодіалізу.

Значну роль у перебігу оксидативних процесів відіграє система

антиоксидантного захисту. У плазмі хворих на ХНН до ГД активність СОД, каталази та ГПР достовірно не відрізнялась, у порівнянні з показниками контрольної групи (табл. 5). Після ГД активність каталази достовірно була зниженою ($p<0,05$), порівняно з показниками контролю. Отримані результати свідчать, що ензимна ланка системи антиоксидантного захисту має достатній рівень компенсаторних можливостей.

Таблиця 5 - Активність СОД, каталази та глутатіонпероксидази у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих з ХНН до та після гемодіалізу ($M\pm m$)

Характеристика груп	СОД, мкмоль НСТ/хв·мг протеїну	Каталаза, H_2O_2 /хв·мг протеїну	ГПО, мкмоль/хв·мг протеїну
Плазма крові			
Контроль, n=20	27,0±2,8	1,68±0,2	43,7±7,5
Хворі на ХНН до ГД, n=42	30,3±4,4	1,22±0,6	53,66±9,0
Хворі на ХНН після ГД, n=42	24,6±4,4	0,99±0,61*	43,54±3,2
Лізат лімфоцитів			
Контроль, n=20	24±1,6	0,54±0,22	43,71±7,5
Хворі на ХНН до ГД, n=42	19,5±1,4 *	0,29±0,12*	43,68±13,3
Хворі на ХНН після ГД, n=42	18,1±1,5*	0,19±0,09 *	42,96±10,1

Примітка 1. * - достовірність змін відносно контрольних значень ($p<0,05$).

Примітка 2. # - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p<0,05$).

Вміст одного з основних вітамінів антиоксидантів – вітаміну С, його загальної та окисненої форм, знижувався на 45% ($p<0,05$) та на 19% ($p<0,05$) відповідно, у порівнянні з показниками групи донорів. Після ГД концентрація загальної форми вітаміну С зменшувалась на 27% ($p<0,05$), окисненої форми – на 25% ($p<0,05$), у порівнянні з показниками до ГД.

У лізаті лімфоцитів у хворих з ХНН вміст ТБК-активних продуктів зростав на 23% ($p<0,05$) (рис. 1Б). Порівнюючи зміни вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів у хворих у ХНН, слід відзначити, що у лімфоцитах вміст ТБК-активних продуктів зростав на меншу величину (на 23%), тоді як у плазмі крові на 33% ($p<0,05$), однак, у плазмі крові вміст ТБК-активних продуктів був у 3,4 рази вищим, ніж у лімфоцитах. Після гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах зменшився на 22% ($p<0,05$), а у плазмі крові на – 15% ($p<0,05$).

У лізаті лімфоцитів у хворих з ХНН активність СОД та каталази, порівнюючи з показниками контрольної групи, була нижчою (на 19% та 44%, $p<0,05$, відповідно), активність ГПО виражено не змінювалась. Слід відзначити, що активність СОД та каталази у плазмі крові до ГД були вищими, ніж у лімфоцитах ($p<0,05$).

Після ГД, у порівнянні з показниками до ГД, у лізаті лімфоцитів активність СОД та глутатіонпероксидази, достовірно не змінювались, активність каталази мала тенденцію до зниження. При цьому, активність СОД і, особливо, каталази після ГД були значно нижчими, порівняно з показниками групи донорів, що свідчить про

вплив процедури ГД на активність каталази лімфоцитів.

Зміни активності системи L-аргінін/нітрогену оксид/аргіназа, гідрогену сульфідру та оксидативних процесів у плазмі крові хворих з ХНН та цукровим діабетом 2-го типу до та після гемодіалізу. Вміст L-аргініну у плазмі крові хворих на ХНН був на 29% ($p < 0,05$) нижчим, ніж у групі донорів (табл. 6).

Таблиця 6 - Показники системи NO та рівень гідроген сульфідру в плазмі крові та лізаті лімфоцитів у хворих з ХНН на тлі діабетичної нефропатії до та після гемодіалізу ($M \pm m$)

Показники	L-аргінін, мкг/мл	Нітрит-аніон, мкмоль/л	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$, мкмоль/л	H_2S , мкмоль/л
Плазма крові				
Контроль, n=20	93,3±16,9	0,83±0,07	3,21±0,58	86,6±7,22
Хворі на ХНН та ЦД 2-го типу до ГД, n=20	66,43±6,79*	0,77±0,06	4,1±1,21	65,2±7,6*
Хворі на ХНН та ЦД 2-го типу після ГД, n=20	48,65±11 [#]	0,67±0,04	3,08±0,21	56,7±5,28
Лізат лімфоцитів				
Контроль, n=20	35,5±3,8	0,7±0,05	2,85±0,3	79,6±3,47
Хворі на ХНН та ЦД 2-го типу до ГД, n=20	23,1±4,9*	0,64±0,04	3,4±0,57	66,7±9,13
Хворі на ХНН та ЦД 2-го типу після ГД, n=20	18,1±3,2 [#]	0,57±0,04 [#]	2,91±0,76	59,1±6,33*

Примітка 1. * - достовірність змін відносно контрольних значень ($p < 0,05$)є

Примітка 2. [#] - достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).

Зниження вмісту L-аргініну у хворих з та без ЦД до та після ГД було майже на одному рівні. Це вказує на те, що гіперглікемія не викликає суттєвого впливу на рівень L-аргініну у зв'язку з домінуванням патологічних процесів викликаних ХНН.

У хворих з ХНН та ЦД 2-го типу концентрація NO_2^- в плазмі крові була на рівні показників хворих з ХНН без ЦД, також не виявлено статистично значущих відмінностей і щодо сумарного вмісту $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ в плазмі крові. Отримані результати можуть свідчити про відсутність значного впливу хронічної гіперглікемії на систему NO в плазмі у хворих з ХНН.

Вміст H_2S був меншим на 25% ($p < 0,05$), ніж у контрольної групи і не відрізнявся від показників хворих з ХНН без ЦД, тобто гіперглікемія не впливала на рівень продукції гідрогену сульфідру у хворих з ХНН як до, так і після гемодіалізу.

У лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу до ГД концентрація L-аргініну зменшувалась на 35% ($p < 0,05$), тоді як вміст нітрит-аніона та сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ виражених змін досліджуваних показників не відзначено, у порівнянні з відповідними показниками хворих з ХНН без ЦД. Концентрація H_2S зменшилась на 16% ($p < 0,05$) порівняно з показниками групи донорів, що було незначно менше від показників контрольної групи (20%).

Після ГД у лізаті лімфоцитів хворих з ХНН та ЦД 2-го типу зміни концентрації L-аргініну, нітрит-аніона та сума $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ 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%, порівняно з показниками до ГД. Активність аргінази у хворих з ХНН та ЦД 2-го типу зростала у більшій мірі (на 42%), ніж у хворих з ХНН без ЦД.

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 групи донорів і також переважав показники хворих на ХНН без ЦД у три рази ($p < 0,01$). Активність eNOS знижувалась на 20%, тоді як у хворих з ХНН без ЦД активність eNOS знижувалась 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. Що стосується змін процесів ліпопероксидації у плазмі крові хворих з ХНН з наявним ЦД 2-го типу, то концентрація ТБК-активних продуктів зростала на 30% ($p < 0,05$), що суттєво не відрізнялось від показників хворих з ХНН без ЦД.

Активність СОД у плазмі крові була менша, тоді як активність каталази була зниженою на 38% ($p < 0,05$), ніж у хворих з ХНН без ЦД. Активність мієлопероксидази також була меншою, ніж у хворих з ХНН без ЦД. Загальний вміст вітаміну С та його окиснена форма достовірно не відрізнялись від показників хворих ХНН без ЦД. Зміни основних показників нітрузо-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 значно нижчий рівень активності каталази та 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. Вміст H_2S не відрізнявся від показників хворих з ХНН без ЦД. Вміст ТБК-активних продуктів у хворих на ХНН та 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. Після ГД вміст ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів повертався до вихідних значень.

У хворих з ХНН та ЦД 2-го типу рівень активності СОД до ГД був нижчим на 22% ($p < 0,05$) порівняно з показниками хворих з ХНН без ЦД. Це може бути зумовлено глікозилюванням ряду амінокислотних залишків СОД або впливом продуктів глікозилювання на процеси експресії СОД. Активність каталази у хворих з ХНН з ЦД 2-го типу до ГД була меншою на 37%, ніж у хворих з ХНН без ЦД. Після сеансу ГД у хворих з ХНН з ЦД 2 типу активність вказаних антиоксидантних ензимів залишалась такою ж низькою, як і до сеансу ГД. Отже, у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих на ХНН з наявним ЦД 2-го типу були виявлені

відмінності перебігу нітросо-оксидативних процесів, що можливо обумовлені гіперглікемією.

Таким чином, у хворих на ХНН різної етіології відбуваються зміни функціонування системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативних процесів, що обумовлено зростанням вмісту у плазмі крові вазоконстрикторів (норадреналіну, асиметричного та симетричного диметиларгініну), зниженням продукції вазодилататорів (нітроген оксиду та гідроген сульфїду), підвищенням процесів ліпопероксидації та зміною активності ензимів антиоксидантного захисту та зниженням вмісту вітаміну С та L-аргініну.

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 сульфїду 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.

5. 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 ПРАЦЬ, ЩО ОПУБЛІКОВАНІЗА 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.**, Дзідз'як 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.**, Скляров 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.

АНОТАЦІЯ

Іваночко Р. Б. Стан системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназата особливості оксидативних процесів у хворих з хронічною нирковою недостатністю за умов гемодіалізу. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.07 – медична біохімія. – Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2018.

Дисертація присвячена вивченню ролі системи L-аргінін/NO-синтази/аргіназа та оксидативних процесів у хворих з хронічною нирковою недостатністю за умов діалізу.

З'ясовано, що у плазмі хворих на хронічну ниркову недостатність на тлі уремії відзначається ендотеліальна дисфункція, що супроводжується зменшенням вмісту у плазмі крові та лізаті лімфоцитів вазодилітаторів (нітроген оксиду та гідроген сульфід), зростанням вмісту норадреналіну, підвищення процесів пероксидного окиснення ліпідів, вмісту асиметричного та симетричного диметиларгеніну і зниженням вмісту вітаміну С та L-аргініну; окрім цього у лізаті лімфоцитів зростала активність iNOS та зменшувалась активності eNOS, у

порівнянні з контрольною групою. Після гемодіалізу, у порівнянні з показниками до діалізу, у плазмі крові та лізаті лімфоцитів ще вираженіше знижувалась концентрація L-аргініну, нітрит-аніона, асиметричного та симетричного диметиларгеніну, гідроген сульфїду, вітаміну С, ТБК-активних продуктів та рівень активності аргїнази. Сеанс гемодіалізу у хворих на хронїчну ниркову недостатність спричиняє різке зниження активності іNOS та eNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніону у лізаті лімфоцитів.

Виявлені особливості зміни основних показників нітрузо-оксидативних процесів та системи антиоксидантного захисту у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих хронїчною нирковою недостатністю з наявним цукровим діабетом.

Ключові слова: хронїчна ниркова недостатність, L-аргїнін/NO-синтаза/аргїназа, оксидативні процеси, гемодіалїз, вітамін С, катехоламіни.

АННОТАЦІЯ

Иваночко Р. Б. Состояние системы L-аргинин/NO-синтаза/аргиназа и особенности оксидативных процессов у больных с хронической почечной недостаточностью в условиях гемодиализа. - На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук (доктора философии) по специальности 14.01.32 – медицинская биохимия. - Винницкий национальный медицинский университет им. М.И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2018.

Диссертация посвящена изучению роли системы L-аргинин / NO-синтаза / аргиназа и оксидативных процессов у больных с хронической почечной недостаточностью разной этиологии получающих лечение гемодиализом. Установлено, что в плазме и лизате лимфоцитов больных с хронической почечной недостаточностью на фоне уремии отмечается эндотелиальная дисфункция, которая сопровождается снижением содержания вазодилататоров (нитроген оксида и гидроген сульфид), увеличением содержания норадреналина, повышением процессов перекисного окисления липидов, содержания асимметричного и симметричного диметиларгинина и снижением концентрации витамина С и L-аргинина; в лизате лимфоцитов повышалась активность іNOS и снижалась активность eNOS. После сеанса гемодиализа, по сравнению с показателями до диализа, в плазме крови и лизате лимфоцитов значительно снижались концентрация L-аргинина, нитрит-аниона, асимметричного и симметричного диметиларгинина, гидроген сульфид, витамина С, содержание ТБК-активных продуктов и активность аргиназы.

Показаны особенности изменений основных показателей нитрузо-оксидативных процессов и системы антиоксидантной защиты в плазме крови и лизате лимфоцитов больных с хронической почечной недостаточностью и сахарным диабетом второго типа.

Ключевые слова: хроническая почечная недостаточность, L-аргинин / NO-синтаза / аргиназа, оксидативные процессы, гемодиализ, витамин С, катехоламины.

ANNOTATION

Ivanochko R.B. The status of L-arginine / NO-synthase / arginase system and features of oxidative processes in patients with chronic renal failure under conditions of hemodialysis. – Manuscript.

The thesis to obtain the academic degree of Candidate of Medical Sciences on specialty 14.01.32 – medical biochemistry. – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2018.

The dissertation is devoted to the evaluation of the role of L-arginine / NO-synthase / arginase system and oxidative processes in patients with chronic renal insufficiency under dialysis conditions.

In chronic renal failure (CRF) activation of lipid peroxidation and alteration in the system L-arginine/NO-synthase/arginase are integrated in the mechanisms of formation of the endothelial dysfunction, hypertension, increase of the level of circulating cytokines, disturbance of the functional condition of platelets. Potent factors of the development of L-arginine/NO-synthase/arginase system dysfunction in CRF may include changes of the production of different vasoactive regulators, such as hydrogen sulphide and catecholamines as well as endogenous analogues of arginine – asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA), having negative prognostic value.

Aim of research was to determine the change in activity of NO-synthase system, lipid peroxidation processes and antioxidant defense components, hydrogen sulfide and catecholamines in plasma and lysate lymphocytes before and after hemodialysis in patients with CRF with and without diabetes mellitus.

The patients with CRF before hemodialysis manifested significant changes of the status of L-arginine/NO-synthase/arginase system – in blood plasma L-arginine content was lower (for 33%), sum of $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ increased (2.2-fold); in lymphocytes lysate iNOS activity increased 15-fold ($p < 0.01$), eNOS activity (for 70%) and L-arginine content (for 31%) were lower compared to control. Hemodialysis session in CRF patients caused significant changes – decreased iNOS activity (14-fold), L-arginine content (for 31%) and nitrite-anion (for 21%) in lymphocytes lysate. In CRF patients on the background of diabetes mellitus level of iNOS activity in lymphocytes lysate before hemodialysis was significantly lower (6.5-fold, $p < 0.01$), and eNOS activity higher (for 20%); after hemodialysis iNOS activity decreased significantly (3.3-fold, $p < 0.01$) compared to CRF on the background of glomerulonephritis.

In patients with CRF increased concentration of ADMA (2.3 times, $p < 0.01$) and SDMA (3.4 times, $p < 0.01$) in blood plasma was revealed compared to control group. Concentration of H_2S in blood plasma decreased for 23% in patients with CRF.

No gender differences of catecholamines concentration in patients with CRF before and after hemodialysis were found. The concentration of norepinephrine in plasma was significantly higher (2.3 times, $p < 0.001$), whereas epinephrine and dopamine concentration was not statistically significantly different from that of the control group. Among catecholamines after hemodialysis, the decrease in the concentration of norepinephrine (for 24%, $p < 0.001$) in plasma was detected.

In blood plasma and lymphocytes of CRF patients before hemodialysis increased

activity of lipid peroxidation processes was noted (TBA-active products level was 33% and 23% higher relevantly, $p < 0.05$), activity of SOD, catalase and glutathione peroxidase did not change significantly, whereas vitamin C concentration, its total and oxidized form decreased for 45% (< 0.05) and 25% (< 0.05) comparatively with the control group.

After hemodialysis TBA-active products content in lymphocytes and blood plasma in CRF patients decreased for 22 % and 15 % ($p < 0.05$); concentration of total and oxidised form of vitamin C in plasma decreased for 27 % and 25 % ($p < 0.05$) and activity of SOD, catalase, glutathione peroxidase had tendency to decrease.

In patients with CRF of different etiology the changes of L-arginine/NO-synthase/arginase functioning and oxidative processes occur, mediated by the increase of vasoconstrictors (norepinephrine and symmetric dimethylarginine) content in blood plasma, decreased production of vasodilators (nitric oxide and hydrogen sulphide), enhanced processes of lipid peroxidation and change of antioxidant enzymes activity and decreased content of vitamin C and L-arginine.

Keywords: chronic kidney disease, hemodialysis, NO-synthase, L-arginine, arginase, lipid peroxidation, vitamin C, catecholamines.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АДМА	– асиметричний диметиларгінін
ГД	– гемодіаліз
ГПО	– глутатіонпероксидаза
СДМА	– симетричний диметиларгінін
СОД	– супероксиддистутаза
ПОЛ	– перекисне окиснення ліпідів
ТБК	– активні продукти – продукти тіобарбітурової кислоти
ХНН	– хронічна ниркова недостатність
ЦД	– цукровий діабет
eNOS	– ендотеліальна NO-синтаза
NO	– нітрогену оксид
NO ₂ ⁻	– нітрит-аніон
iNOS	– індуцибельна NO-синтаза
H ₂ S	– гідроген сульфід
oxLDL	– окиснені ліпопротеїни низької щільності

Підписано до друку 23.05.2018 р. Замовл. № 133.
Формат 60x90 1/16 Ум. друк. арк. 0,8 Друк офсетний.
Наклад 100 примірників.

Вінниця. Друкарня ВНМУ ім. М.І. Пирогова, Пирогова, 56.