

СТАН СИСТЕМИ NO-СИНТАЗА/АРГІНАЗА Й ОКСИДАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ У ЛІМФОЦИТАХ КРОВІ ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ ДО ТА ПІСЛЯ СЕАНСУ ГЕМОДІАЛІЗУ

Вивчено стан системи NO-синтаза/аргіназа та оксидативних процесів у лізатах лімфоцитів крові хворих із хронічною нирковою недостатністю за умов гемодіалізу. Показано зростання нітратоксидативного стресу в лімфоцитах порівняно з контрольною групою. Гемодіаліз викликав різке зниження активності iNOS, eNOS, вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну, нітрит-аніона в лізаті лімфоцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: NO-синтаза, аргіназа, ТБК-активні продукти, нітрит-аніон, L-аргінін, лімфоцити, хронічна ниркова недостатність.

ВСТУП. Розвиток хронічної ниркової недостатності (ХНН) супроводжується дисфункцією ендотеліоцитів, гіпертензією, підвищенням вмісту цитокінів, що циркулюють у крові, зміною функцій клітин крові, оксидативним стресом та порушенням системи NO-синтаза/аргіназа [12, 21]. У пацієнтів із ХНН V ступеня основним методом лікування є замісна ниркова терапія (ЗНТ), завдяки якій забезпечується продовження тривалості життя.

У хворих із ХНН, які отримують ЗНТ методом гемодіалізу, відзначають зниження концентрації амінокислоти L-аргініну в крові, яка є субстратом для NO-синтаз та аргінази, і вмісту нітрогену оксиду (NO), що викликає розвиток ендотеліальної дисфункції [4, 9].

Наскільки сама процедура проведення гемодіалізу (ГД) впливає на показники активності NO-синтаз, вміст нітрогену оксиду та його похідних, а також оксидативні процеси, на сьогодні детально вивчають. Показано, що сеанс ГД викликає зниження рівня нітритів, асиметричного диметиларгініну, гомоцистеїну [13].

Відносно змін вмісту нітратів при ГД дані літератури є неоднозначними – відзначено як зростання їх концентрації, так і зниження [3, 4, 9, 13].

Серед факторів, що впливають на вміст та рівень біоактивності NO у плазмі крові при ГД, виділяють такі: зниження синтезу ендогенного L-аргініну та його надходження в організм з

© Р. Б. Іваночко, О. Я. Склярів, 2014.

їжею; використання L-аргініну в інших метаболічних процесах (аргіназою тощо); зменшення рівня транспорту L-аргініну в ендотеліоцити; збільшення вмісту асиметричного диметиларгініну та інших метаболітів нітрогену оксиду, які блокують активність NO-синтази, зниження реабсорбції L-аргініну в ниркових канальцях [9, 16]. Окрім цього, протягом ГД відбувається зростання виділення прозапальних цитокінів, які підвищують синтез NO, активуючи індукбельну NO-синтазу (iNOS); вміст NO може зменшуватись внаслідок його деградації, зниження активності NO-синтази, а також у результаті внутрішньосудинного гемолізу еритроцитів та виходу в плазму крові гемоглобіну, з яким NO швидко взаємодіє [16, 17].

Значну роль у функціонуванні ендотеліальної системи та формених елементів крові хворих із ХНН відіграють зростання оксидативних процесів та зниження активності антиоксидантного захисту. Рівень оксидативного стресу підвищується з прогресуванням розвитку ХНН [2, 5, 19].

Однак щодо зміни вмісту ТБК-активних продуктів при ГД у літературі є різноспрямовані результати – як зростання їх вмісту в плазмі крові після сеансу ГД [3], так і зниження [4, 13].

За умов ГД зміни активності NO-синтаз, вмісту нітрогену оксиду та процесів ліпопероксидації відбуваються також у формених елементах крові, зокрема в лімфоцитах. Відомо,

що лімфоцити крові беруть участь у підтримці імунологічного статусу організму, синтезують про- й антизапальні цитокини і NO, яке бере участь в їх розвитку, диференціації та функціонуванні [10, 20].

Метою даної роботи було дослідити зміни активності показників NO-синтази, аргінази і процесів ліпопероксидації у лімфоцитах крові хворих із хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідження було включено 18 хворих (8 чоловіків, 10 жінок) із ХНН V ступеня (гломерулонефрит), які отримували ЗНТ методом ГД. Середній вік пацієнтів становив 56 років. Артеріальний тиск у хворих із ХНН становив: систолічний – 170 мм рт. ст., діастолічний – 85 мм рт. ст. Групу порівняння склали 20 донорів (їх кров) середнім віком – 48 років.

Обстеження проводили на базі відділення хронічного гемодіалізу Львівської обласної клінічної лікарні. ЗНТ методом гемодіалізу здійснювали 3 рази на тиждень по 4 год з використанням синтетичних діалізаторів і бікарбонатного буфера. Кров для дослідження в кожного хворого забирали зі сформованого судинного доступу “A-V” фістули до та після ГД. Дослідження проведено з дотриманням біоетичних норм.

Для оцінки стану системи NO-синтаза/аргіназа визначали активність NO-синтази (ендотеліальної – eNOS та індукційної – iNOS) [7], вміст L-аргініну [1], нітрит-аніона [15] та актив-

ність аргінази [14]. Рівень процесів ліпопероксидації оцінювали за вмістом ТБК-активних продуктів [6], антиоксидантний захист – визначаючи активність супероксиддисмутази (СОД) [8]. Лізат лімфоцитів готували згідно з [11].

Статистичну обробку експериментальних результатів проводили з використанням прикладної програми ANOVA “Statistica”. Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У лізаті лімфоцитів хворих із ХНН, порівняно з контрольною групою обстежених, було відзначено: зростання рівня активності iNOS у 15 разів ($p < 0,01$) та вмісту ТБК-активних продуктів на 23 % ($p < 0,05$); зниження рівня активності eNOS на 70 % ($p < 0,05$), СОД на 19 %, вмісту L-аргініну на 31 % ($p < 0,05$). Активність аргінази та вміст нітрит-аніона виражено не змінювалась (табл. 1, 2).

Після сеансу гемодіалізу в лізаті лімфоцитів, порівняно з показниками до ГД, різко знижувався рівень активності iNOS (у 14 разів) та eNOS (у 8 разів). Паралельно зменшувалась концентрація L-аргініну на 30 % ($p < 0,05$), нітрит-аніона на 15 % ($p < 0,05$), ТБК-активних продуктів на 22 % ($p < 0,05$) порівняно з показниками до діалізу. Активність аргінази мала спрямованість до зростання.

Отже, проведення сеансу ЗНТ методом ГД у хворих із ХНН V ступеня спричиняло різке зниження активності iNOS та eNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну і нітрит-аніона в лізаті лімфоцитів.

Таблиця 1 – Вміст у лізаті лімфоцитів L-аргініну, нітрит-аніона та активність NO-синтази й аргінази у хворих із хронічною нирковою недостатністю до і після гемодіалізу

Група досліджених	L-аргінін, мкг/мл	Нітрит-аніон, мкмоль/л	iNOS, нмоль/хв·мл	eNOS, нмоль/хв·мл	Аргіназа, мкмоль/хв·мг
Контроль	35,5±3,8	19,8±1,6	0,06±0,02	0,81±0,17	0,22±0,05
Лімфоцити до ГД	24,6±3,2*	18,6±1,5	0,89±0,19**	0,24±0,08*	0,19±0,04
Лімфоцити після ГД	17,1±2,7#	15,9±1,1#	0,06±0,02##	0,03±0,01##	0,23±0,03

Примітки:

- * – достовірність змін відносно контрольних значень ($p < 0,05$).
- ** – достовірність змін відносно контрольних значень ($p < 0,01$).
- # – достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,05$).
- ## – достовірність змін відносно показників до гемодіалізу ($p < 0,01$).

Таблиця 2 – Концентрація у плазмі крові ТБК-активних продуктів та активність супероксиддисмутази у хворих із хронічною нирковою недостатністю до та після гемодіалізу

Група досліджених	ТБК-активні продукти, мкмоль/г·тк	СОД, мкмоль НСТ/ хв·мг білка
Контроль	26±2,2	24±1,6
Лімфоцити до ГД	31,9±3,2*	19,5±1,4*
Лімфоцити після ГД	24,8±3,3#	18,1±5

Примітки:

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

Прогресування розвитку ХНН супроводжується ендотеліальною дисфункцією та зростанням рівня нітратооксидативного стресу, що проявляється відповідними змінами вмісту ТБК-активних продуктів, нітратів, нітритів, асиметричного диметиларгініну, L-аргініну, активності ензимів антиоксидантного захисту як у плазмі крові, так і формених елементах крові, зокрема лімфоцитах.

У хворих із ХНН у термінальній стадії, які отримували сеанси ГД, відзначають зростання оксидативних процесів, про що свідчить підвищення вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові [2, 4, 5, 19]. У наших дослідженнях показано збільшення ТБК-активних продуктів у лізаті лімфоцитів пацієнтів із ХНН V ступеня порівняно з показниками контрольної групи. Паралельно в лімфоцитах різко підвищувалась активність iNOS, знижувались активність eNOS та вміст L-аргініну. Отримані результати свідчать про активацію нітратооксидативного стресу в лімфоцитах крові, що буде викликати порушення їх функцій.

Після сеансу ГД у лізаті лімфоцитів відзначали зниження рівня активності iNOS та eNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона порівняно з відповідними показниками до ГД.

Проведення сеансу ГД, при якому відбувається механічний контакт компонентів плазми крові та формених елементів з діалізною мембраною, викликає різносторонні ефекти – як зростання процесів пероксидного окиснення ліпідів [3], так і виведення продуктів їх метаболізму під час діалізу. Про те, наскільки вплив ГД змінює стан нітратооксидативних процесів у крові та формених елементах, свідчить зміна відповідних показників.

Після ГД у плазмі крові знижується вміст ТБК-активних продуктів, L-аргініну, нітрит-аніона, вітаміну С [4, 9, 18]. Подібні зміни вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона спостерігають і в лізаті лімфоцитів.

Оцінюючи вплив ГД на стан системи NO-синтаза/аргіназа, слід зазначити, що до ГД у лізаті лімфоцитів були різко підвищена активність iNOS, зменшені рівень активності eNOS та вміст L-аргініну порівняно з контрольною групою. Після ГД відмічено різке зниження не тільки активності iNOS, але і рівня активності eNOS із паралельним зменшенням вмісту L-аргініну та нітрит-аніона. Активність аргінази мала тенденцію до зростання. Значне зниження рівня eNOS може викликати порушення у функціонуванні лімфоцитів після діалізу з подальшим погіршенням імунного захисту.

Таким чином, сеанс ГД у хворих із ХНН V ступеня спричиняє зниження рівня нітратооксидативного стресу в лімфоцитах, при цьому різко зменшувались активність як iNOS, так і eNOS та вміст L-аргініну.

ВИСНОВКИ. 1. У лізаті лімфоцитів хворих із ХНН V ступеня, які отримували ЗНТ методом ГД, відзначено зростання вмісту ТБК-активних продуктів, активності iNOS, зменшення активності eNOS та вмісту L-аргініну порівняно з контрольною групою.

2. Сеанс ГД у хворих із ХНН V ступеня спричинив різке зниження активності iNOS та eNOS, ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона, зростання активності аргінази в лізаті лімфоцитів.

3. Зниження активності eNOS та L-аргініну в лімфоцитах після ГД може викликати зменшення імунологічного захисту у хворих із ХНН та впливати на тривалість життя.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алейникова Т. Л. Руководство к практическим занятиям по биохимии / Т. Л. Алейникова, Г. В. Рубцова. – М. : Высшая школа, 1988. – 239 с.
2. Антиоксидантна система, церулоплазмин-трансферин та стан коморбідності у хворих на хронічну хворобу нирок, які лікуються гемодіалізом / Л. В. Король, Л. Я. Мигаль, І. О. Дудар [та ін.] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2011. – 4. – С. 35–39.
3. Вплив сеансу гемодіалізу на структурно-функціональний стан ендотелію у хворих із термінальною нирковою недостатністю / А. І. Гоженко,

- О. Б. Сусла, А. А. Клим, О. З. Яремчук // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2013. – 3. – С. 102–107.
4. Іваночко Р. Б. 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, О. Я. Складаров // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2014. – № 1. – С. 66–71.
5. Прогресування хронічної хвороби нирок: стан оксидативного стресу на різних стадіях ХНН / І. О. Дудар, О. М. Лобода, Л. В. Король [та ін.] //

Укр. журнал нефрології та діалізу. – 2012. – **2**. – С. 18–24.

6. Сумбаев В. В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В. В. Сумбаев, И. М. Ясинская // Совр. пробл. токсикологии. – 2000. – № 3. – С. 3–7.

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

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

9. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease / C. Baylis // Amer. J. Physiol – Renal Physiol. – 2008. – **294**. – № F1–F9.

10. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide / C. Bogdan // Methods Mol. Biol. – 2011. – **677**. – P. 375–393.

11. Boyum A. A. A one-stage procedure for isolation of granulocytes and lymphocytes from human blood / A. A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – **21**, suppl. 97. – P. 51–76.

12. Effect of a single hemodialysis session on endothelial dysfunction / P. R. Errakonda, P. Pamakrishna, A. R. Bitla [et al.] // J. Nephrol. – 2011. – **24**, № 1. – P. 83–90.

13. Effects of lipoprotein-associated phospholipase A2 on arginase/nitric oxide pathway in hemodialysis patients / A. K. Tektas, S. Uslu, A. U. Yalcin [et al.] // Ren. Fail. – 2012. – **34**, № 6. – P. 738–743.

14. Geyer J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. – 1971. – **39**, № 2. – P. 412–417.

15. Green L. C. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids / L. C. Green, A. W. David // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131–138.

16. Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress / T. Weinstein, A. Chagnac, A. Korzets [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2000. – **15**. – P. 883–887.

17. Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function / C. Meyer, C. Heiss, C. Drexhage [et al.] // J. Amer. Coll. Cardiol. – 2010. – **55**, № 5. – P. 454–459.

18. Hon W. M. Effect of hemodialysis on plasma nitric oxide levels / W. M. Hon, J. C. Lee, K. H. Lee // Artif. Organs. – 2000. – **24**, № 5. – P. 387–390.

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

20. Uremia, atherothrombosis and malnutrition: the role of L-arginine-nitric oxide pathway / T. M. Brunini, C. D. da Silva, M. A. Siqueira [et al.] // Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets. – 2006. – **6**, № 2. – P. 133–140.

21. Weinberg J. B. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review / J. B. Weinberg // Molecular Med. – 1998. – **4**. – P. 557–591.

Р. Б. Иваночко, А. Я. Скляр

Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ NO-СИНТАЗА/АРГИНАЗА И ОКСИДАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ДО И ПОСЛЕ СЕАНСА ГЕМОДИАЛИЗА

Резюме

Изучено состояние системы NO-синтаза/аргиназа и оксидативных процессов в лимфоцитах крови больных с хронической почечной недостаточностью в условиях гемодиализа. Продемонстрировано рост нитрозооксидативного стресса в лимфоцитах по сравнению с контрольной группой. Гемодиализ спровоцировал резкое снижение активности iNOS, eNOS, содержания ТБК-активных продуктов, L-аргинина, нитрит-аниона в лизате лимфоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: NO-синтаза, аргиназа, ТБК-активные продукты, нитрит-анион, L-аргинин, лимфоциты, хроническая почечная недостаточность.

STATUS OF NO-SYNTHASE/ARGINASE SYSTEM AND OXIDATIVE PROCESSES IN LYMPHOCYTES LYSATE IN BLOOD OF PATIENTS WITH CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY AFTER THE SESSION OF HEMODIALYSIS

Summary

The status of NO-synthase/arginase system and oxidative processes in lymphocytes lysate in blood of patients with chronic renal failure under conditions of hemodialysis was investigated. The increase of nitrosooxidative stress of lymphocytes compared with the control group was shown. Hemodialysis caused an acute decrease of iNOS, eNOS activity, TBA-active products content, L-arginine, nitrite-anion in lymphocytes lysate.

KEY-WORDS: NO-synthase, arginase, TBA-active products, nitrite-anion, L-arginine, lymphocytes, chronic renal insufficiency.

Отримано 10.04.14

Адреса для листування: О. Я. Склярів, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69, Львів, 79010, Україна, e-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua.