

**Р. Б. Іваночко<sup>1</sup>, О. О. Абрагамович<sup>2</sup>,  
І. В. Кравчук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня»

<sup>2</sup> Львівський національний медичний університет  
імені Данила Галицького

## Особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативних процесів у хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю внаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу

**Вступ.** Останнім часом дослідники приділяють значну увагу вивченню зв'язку між хронічною хворобою нирок (ХНН) і виникненням різноманітних ускладнень, які супроводжуються змінами системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативним стресом [4, 7, 15, 28, 31].

За умов хронічної ниркової недостатності (ХНН) потенційними чинниками формування дисфункції системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа можуть виступати зміни продукції інших вазоактивних регуляторів, таких як гідроген сульфід. Адже гідроген сульфід є біологічно активним агоністом системи NO щодо регуляції судинного тонуусу й синтезу нітрозотіолів [5, 25, 39], уміст якого зменшується у крові хворих із уремією [38].

Уремія є провідним чинником змін активності NO-синтази ендотеліоцитів судин і клітин паренхіми нирок і виникнення патологічних змін у серцево-судинній системі хворих із ХНН [2, 3, 7, 10, 32]. Як відомо, у разі ХНН дисбаланс у системі L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа може формуватись і внаслідок гіперпродукції ендогенних аналогів аргініну – асиметричного диметиларгініну (АДМА) та симетричного диметиларгініну (СДМА), що свідчить про несприятливий прогноз [19, 23, 35].

У хворих із ХНН змінюються біохімічні процеси у лімфоцитах крові, які відіграють суттєву роль у підтриманні імунологічного статусу організму, що зумовлюється їх фагоцитарною активністю, синтезом про- і антизапальних цитокінів, вивільненням NO за участі індукційної NO-синтази [6, 7, 12, 20, 21, 30]. Також лімфоцитарні клітини здатні до продукції гідрогену сульфіді [18, 33, 34]. Роль наведених чинників

за наявності ХНН різної етіології під впливом сеансу ГД може суттєво модифікуватись.

Порушення в системі L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа й активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) за умов ХНН інтегровані в механізми формування ендотеліальної дисфункції, гіпертензії, збільшення вмісту циркулювальних цитокінів у крові, порушення функціонального стану тромбоцитів [36, 37, 40].

Особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа й оксидативних процесів у хворих із термінальною ХНН унаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу до сьогодні вивчені недостатньо.

**Мета дослідження.** З'ясувати особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа й оксидативних процесів у хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю внаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу.

**Матеріали й методи дослідження.** Після отримання письмової згоди на проведення обстеження відповідно до принципів Гельсінкської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину, відповідних законів України та міжнародних актів, а також погодження з Етичною комісією Львівського національного медичного університету (ЛНМУ) імені Данила Галицького, у дослідження, яке проводили в Комунальному некомерційному підприємстві (КНП) Львівської обласної ради (ЛОР) «Львівська обласна клінічна лікарня», у рандомізований спосіб із попередньою стратифікацією за наявністю у хворих ХНН (хронічний гломерулонефрит) із термінальною

ХНН, що її діагностовано згідно з наказом МОЗ і НАМН України № 280/44 від 11.05.2011 р. «Про затвердження стандарту та уніфікованих клінічних протоколів надання медичної допомоги зі спеціальності нефрологія) та Рекомендаціями щодо поліпшення якості діагностики і лікування хвороб нирок від 2002 р. – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) та 2012 р. – Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) [13], у дослідження залучено 42 хворих (22 жінки (52,38 %), 20 чоловіків (47,62 %), середній вік 56 років), яких лікували методом гемодіалізу (ГД) (тричі на тиждень по чотири години з використанням синтетичних діалізаторів і бікарбонатного буфера).

Кров для дослідження у кожного хворого брали зі сформованого судинного доступу «А-V» фістули до і після сеансу ГД.

Середня тривалість перебування хворих на ГД п'ять років. Артеріальний тиск у хворих із ХНН становив у середньому: систолічний 170 мм рт. ст., діастолічний 85 мм рт. ст.

Контрольну групу (КГ) склали 20 умовно здорових, зіставлених за статтю і віком людей.

Для оцінки NO-синтазної системи визначали вміст L-аргініну – за реакцією Т. Сакагучі [1], активність аргінази (КФ 3.5.3.1) – за кількістю утвореної сечовини [26], активність ізоформ NO-синтази (індуцибельна (iNOS) і ендотеліальна (eNOS)) (КФ 1.14.13.39) – за наявністю нікотинамедаденіндинуклеотидфосфату (Nicotinamed Adenine Dinucleotide Phosphate - NADPH) [13]. Уміст нітрит-аніона  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  визначали за реакцією з реактивом П. Гріса [27], суму  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$  – з використанням суміші цинкового пилу та мангану сульфату (для відновлення нітрату до нітриту) або мангану сульфату (для визначення нітрит-аніона) [8]. Уміст  $\text{H}_2\text{S}$  визначали за реакцією з N,N-диметил-р-фенілендіаміном за наявності  $\text{FeCl}_3$  [24].

Уміст АДМА і СДМА визначали імуноферментним методом ELISA за наборами DLD Diagnostica GmbH (Німеччина).

До і після сеансу гемодіалізу в плазмі крові та лізаті лімфоцитів визначали процеси ліпопероксидації та показники антиоксидантного захисту: вміст активних продуктів тіобарбітурової кислоти (ТБК-активних продуктів) [14], окиснених ліпопротеїнів низької щільності (Oxidized low-density lipoprotein - oxLDL) – імуноферментним методом ELISA із застосуванням наборів реактивів фірми Merckodia AB (Швеція). Визначали активність мілопероксидази (КФ 1.11.1.7) – за реакцією з о-діанізидином [21], глутатіонпероксидази (ГПО; КФ 1.11.1.9) – за швидкістю окиснення глутатіону [11], супероксиддисмутази (СОД; КФ 1.15.1.1) – за реакцією з нітросинім тетразолієм [16], каталази (КФ 1.16.1.6) – за реакцією пероксиду водню з молібдатом амонію [9], а також уміст загальної та окисненої форм вітаміну С [17].

Для обробки отриманих показників використовували пакет MS Office 2007 і статистичну програму Statistica для Windows версії 8.0 фірми StatSoft. Відповідність

розподілу змінних величин гіпотетичному розподілу нормальних величин перевірено за допомогою тесту нормальності С. Шапіро – М. Вілка. За умов нормального розподілу використовували параметричний тест t-Стьюдента, у деяких випадках – непараметричні тести, для порівняння пов'язаних величин – U-критерій Х. Б. Манна – Д. Р. Вітні для двох величин. Виявлену різницю вважали статистично достовірною за  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.**  
*Особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа у хворих із термінальною ХНН внаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу.*

У хворих із термінальною ХНН внаслідок хронічного гломерулонефриту до сеансу гемодіалізу як у плазмі крові, так і в лізаті лімфоцитів фіксували зменшений вміст L-аргініну (на 33,0 % ( $p < 0,01$ ) і 31,0 % ( $p < 0,01$ ) відповідно) порівняно з референтними показниками у здорових осіб. Після сеансу гемодіалізу вміст L-аргініну в плазмі крові зменшувався на 20,0 %, у лізаті лімфоцитів – на 30,0 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками у хворих до сеансу ГД. Тобто сеанс ГД сприяв значному зменшенню вмісту L-аргініну як у плазмі крові, так і в лізаті лімфоцитів.

У плазмі крові здорових осіб КГ вміст  $\text{NO}_2^-$  становив 26,0 % суми  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , у хворих із ХНН – 11,0 %, що свідчить про зменшення вмісту вазодилататорного  $\text{NO}_2^-$  та зростання кількості нітрозильованих молекул.

До сеансу ГД вміст  $\text{NO}_2^-$  як у плазмі крові, так і в лізаті лімфоцитів мав тенденцію до зменшення.

До сеансу ГД вміст  $\text{H}_2\text{S}$  у плазмі крові хворих із ХНН був виразно зменшений на 23,0 % ( $p < 0,01$ ) порівняно з показниками КГ. Після сеансу ГД вміст  $\text{H}_2\text{S}$  у плазмі крові зменшився на 12,0 % ( $p < 0,05$ ).

Сума нітрату+нітриту в лімфоцитах хворих на ХНН до сеансу ГД була трохи більша, ніж у осіб КГ, однак значно менша, ніж у плазмі крові – на 52,0 % ( $p < 0,05$ ), що свідчить про зростання нітрозомісних продуктів у плазмі крові. У лізаті лімфоцитів, порівняно з плазмою крові хворих у ХНН, уміст нітрит-аніона був меншим і його динаміка змін після сеансу ГД достовірно не відрізнялась від показників у КГ. Однак джерела NO у плазмі крові та лімфоцитах різні – NO потрапляє у кров головним чином із ендотеліоцитів, а в цитоплазмі лімфоцитів локалізується NO-синтаза, яка продукує нітроген оксид із L-аргініну.

У лізаті лімфоцитів уміст  $\text{H}_2\text{S}$  суттєво не відрізнявся від показників у КГ. Після сеансу ГД вміст  $\text{H}_2\text{S}$  у лізаті лімфоцитів зменшився на 23,0 % ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

У хворих із ХНН до сеансу ГД концентрація АДМА та СДМА в плазмі крові була значно вища, ніж у крові донорів. Так, у плазмі хворих із ХНН концентрація АДМА була у 2,3 разу вища ( $p < 0,01$ ), а концентрація СДМА – у 3,4 разу вища ( $p < 0,01$ ), ніж у крові донорів (табл. 2). Після сеансу ГД концентрація АДМА та СДМА в плазмі крові хворих із ХНН знизилася на 49,0 % ( $p < 0,05$ ) і 48,0 % ( $p < 0,05$ ) відповідно.

Таблиця 1

Уміст L-аргініну, нітрит-аніона, гідрогену сульфід у суми нітратів і нітритів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю до і після сеансу гемодіалізу ( $M \pm m$ ;  $n$ ;  $p$ )

Групи	L-аргінін, мкг/мл	Нітрит-аніон, мкмоль/л	$\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , мкмоль/л	$\text{H}_2\text{S}$ , мкмоль/л
Хворі з ХНН до сеансу ГД, $n = 42$	Плазма крові			
	$62,30 \pm 12,10^{**}$	$0,76 \pm 0,06$	$7,00 \pm 1,55^{**}$	$66,50 \pm 5,40^{**}$
Хворі з ХНН після сеансу ГД, $n = 42$	$49,90 \pm 10,80^{\#}$	$0,68 \pm 0,05^*$	$5,30 \pm 1,16$	$54,40 \pm 3,70^{\#}$
КГ, $n = 20$	$93,30 \pm 16,90$	$0,83 \pm 0,07$	$3,20 \pm 0,58$	$86,60 \pm 7,20$
Хворі з ХНН до сеансу ГД, $n = 42$	Лізат лімфоцитів			
	$24,60 \pm 3,20^*$	$0,61 \pm 0,05$	$3,30 \pm 1,39$	$63,80 \pm 4,70$
Хворі з ХНН після сеансу ГД, $n = 42$	$17,10 \pm 2,70^{\#}$	$0,48 \pm 0,04^{\#}$	$2,50 \pm 0,57$	$49,30 \pm 4,80^{\#}$
КГ, $n = 20$	$35,50 \pm 3,80$	$0,70 \pm 0,05$	$2,90 \pm 0,30$	$69,60 \pm 3,50$

Примітки: \* – достовірність змін щодо показників у осіб КГ ( $p < 0,05$ ); \*\* –  $p < 0,01$ ; # – достовірність змін щодо показників до гемодіалізу ( $p < 0,05$ ); ## –  $p < 0,01$ .

Таблиця 2

Уміст асиметричного та симетричного диметиларгініну в плазмі крові хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю до і після сеансу гемодіалізу ( $M \pm m$ ;  $n$ ;  $p$ )

Групи	АДМА, ммоль/л	СДМА, ммоль/л
Хворі з ХНН до сеансу ГД, $n = 42$	$1,80 \pm 0,06^{**}$	$2,00 \pm 0,06^{**}$
Хворі з ХНН після сеансу ГД, $n = 42$	$0,92 \pm 0,06^{\#}$	$1,10 \pm 0,06^{\#}$
КГ, $n = 20$	$0,78 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,04$

Примітки: \* – достовірність змін щодо показників у осіб КГ ( $p < 0,05$ ); \*\* –  $p < 0,01$ ; # – достовірність змін щодо показників до сеансу ГД ( $p < 0,05$ ).

Значну роль відіграє показник активності ізоформ NO-синтази в лімфоцитах: у хворих із ХНН активність iNOS зростала в 15 разів ( $p < 0,01$ ); активність eNOS знижувалася на 70,0 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з КГ (табл. 3).

Таблиця 3

Зміни активності NO-синтази (індуцибельна (iNOS) і ендотеліальна (eNOS)) та аргінази в лізаті лімфоцитів хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю до і після сеансу гемодіалізу ( $M \pm m$ ;  $n$ ;  $p$ )

Групи	iNOS, нмоль/хв·мл	eNOS, нмоль/хв·мл	Аргіназа, мкмоль/хв·мл
Хворі з ХНН до сеансу ГД, $n = 42$	$0,89 \pm 0,19^{**}$	$0,24 \pm 0,08^*$	$0,19 \pm 0,04$
Хворі з ХНН після сеансу ГД, $n = 42$	$0,06 \pm 0,02^{\#}$	$0,18 \pm 0,01^{**}$	$0,23 \pm 0,03$
КГ, $n = 20$	$0,06 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,17$	$0,22 \pm 0,05$

Примітки: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$  щодо показників у осіб КГ; # –  $p < 0,05$ , ## –  $p < 0,01$  щодо показників до сеансу ГД.

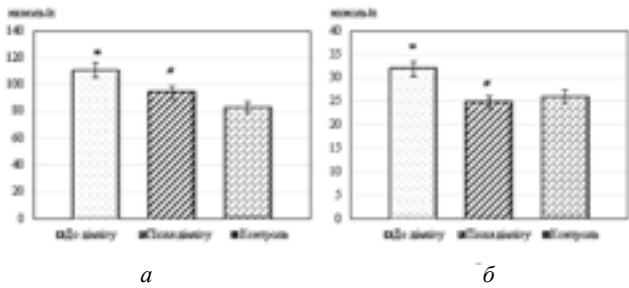
Після сеансу ГД активність iNOS (у 14 разів,  $p < 0,01$ ) та eNOS (у 8 разів,  $p < 0,01$ ) різко знижувалася, що свідчить про вплив процедури ГД на активність лімфоцитарної NO-синтази.

Активність аргінази в плазмі крові хворих із ХНН на 33,0 % вища, ніж у групі донорів, що вказує на посилення неокисного шляху обміну L-аргініну, внаслідок чого збільшується вміст орнітину та поліамінів. До сеансу ГД активність аргінази в лімфоцитах була невірогідно нижча (на 14,0 %,  $p > 0,05$ ), ніж у КГ, після сеансу ГД активність аргінази зростала.

Особливості оксидативних процесів у хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю внаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу.

У хворих на ХНН відбуваються зміни оксидативних процесів і активності ензимів антиоксидантного захисту. До сеансу ГД вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові був більшим на 34,0 % ( $p < 0,05$ ) (див. рисунок, а), вміст oxLDL і активність мієлопероксидази не змінювались порівняно з КГ. Після сеансу ГД вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові зменшився на 14,0 % ( $p < 0,05$ ), активність мієлопероксидази була нижча від референтних значень. Уміст окиснених ліпопротеїнів достовірно не змінювався порівняно з показниками до сеансу ГД. Отже, після сеансу ГД зменшується вміст ТБК-активних продуктів і знижується активність мієлопероксидази.

У лізаті лімфоцитів у хворих із ХНН вміст ТБК-активних продуктів збільшувався на 23,0 % ( $p < 0,05$ ) (див. рисунок, б). Порівнюючи зміни вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів у хворих із ХНН, слід зазначити, що вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах зростав лише на 23,0 %, тоді як у плазмі крові на 33,0 % ( $p < 0,05$ ), однак у плазмі крові вміст ТБК-активних продуктів був у 3,4 разу більшим, ніж у лімфоцитах. Після гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах зменшився на 22,0 % ( $p < 0,05$ ), у плазмі крові на – 15,0 % ( $p < 0,05$ ).



Уміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові (а) та лізаті лімфоцитів (б) хворих із хронічною нирковою недостатністю до і після сеансу гемодіалізу.

**Примітки:** \* – достовірність змін щодо показників у КГ ( $p < 0,05$ ); # – достовірність змін щодо показників до сеансу ГД ( $p < 0,05$ ).

Значну роль у перебігу окисдаєтвних процесів відіграє система антиоксидантного захисту. До сеансу ГД активність СОД, каталази та ГПР у плазмі хворих із ХНН достовірно не відрізнялася від показників у КГ (табл. 4).

Таблиця 4

**Активність супероксиддисмутази, каталази та глутатіонпероксидази у плазмі крові та лізаті лімфоцитів хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю до і після сеансу гемодіалізу ( $M \pm m$ ;  $n$ ;  $p$ )**

Групи	СОД, мкмоль НСТ/хв·мг протеїну	Каталаза, $H_2O_2$ /хв·мг протеїну	ГПО, мкмоль/хв·мг протеїну
Хворі з ХНН до сеансу ГД, $n = 42$	Плазма крові		
	$30,30 \pm 4,40$	$1,22 \pm 0,60$	$53,66 \pm 9,00$
Хворі з ХНН після сеансу ГД, $n = 42$	$24,60 \pm 4,40$	$0,99 \pm 0,61^*$	$43,54 \pm 3,20$
КГ, $n = 20$	$27,00 \pm 2,80$	$1,68 \pm 0,20$	$43,70 \pm 7,50$
Хворі з ХНН до сеансу ГД, $n = 42$	Лізат лімфоцитів		
	$19,50 \pm 1,40^*$	$0,29 \pm 0,12^*$	$43,68 \pm 13,3$
Хворі з ХНН після сеансу ГД, $n = 42$	$18,10 \pm 1,50^*$	$0,19 \pm 0,09^*$	$42,96 \pm 10,10$
КГ, $n = 20$	$24,00 \pm 1,60$	$0,54 \pm 0,22$	$43,71 \pm 7,50$

**Примітки:** \* – достовірність змін щодо показників у осіб КГ ( $p < 0,05$ ); # – достовірність змін щодо показників до сеансу ГД ( $p < 0,05$ ).

У лізаті лімфоцитів хворих із ХНН активність СОД і каталази, порівняно з показниками в КГ, була нижча (на 19,0 і 44,0 %,  $p < 0,05$  відповідно), а активність ГПО виразно не змінювалась. Слід зазначити, що активність СОД і каталази в плазмі крові до ГД була вища, ніж у лімфоцитах ( $p < 0,05$ ).

Після сеансу ГД, порівняно з показниками до сеансу ГД, в лізаті лімфоцитів активність СОД і глутатіонпероксидази достовірно не змінювалась, активність каталази знижувалася. При цьому активність СОД і, особливо, каталази після сеансу ГД була значно нижча, ніж у КГ, що свідчить про вплив процедури ГД на активність каталази лімфоцитів.

Уміст одного з основних вітамінів-антиоксидантів вітаміну С, загальної та окисненої форм, зменшувався на 45,0 % ( $p < 0,05$ ) і на 19,0 % ( $p < 0,05$ ) відповідно порівняно з показниками КГ. Після сеансу ГД концентрація загальної форми вітаміну С знижувалася на 27,0 % ( $p < 0,05$ ), окисненої форми – на 25,0 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками до сеансу ГД.

**Висновки.** У хворих на хронічну ниркову недостатність у термінальній стадії внаслідок хронічного гломерулонефриту виявлено особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та окисдаєтвних процесів, які полягають у виникненні ендотеліальної дисфункції, що супроводжується зменшенням вмісту вазодиліаторів (нітрогену оксиду та гідрогену сульфід) у плазмі крові та лізаті лімфоцитів, посиленні процесів пероксидного окиснення ліпідів, збільшенні вмісту асиметричного та симетричного диметиларгініну й зменшенні вмісту вітаміну С і L-аргініну; окрім цього, в лізаті лімфоцитів зростала активність iNOS та зменшувалася активність eNOS порівняно з контрольною групою.

Після сеансу гемодіалізу, порівняно з показниками до діалізу, в плазмі крові та лізаті лімфоцитів ще виразніше знижувалися концентрація L-аргініну, нітрит-аніона, асиметричного та симетричного диметиларгініну, гідрогену сульфід, вітаміну С, ТБК-активних продуктів, а також активність аргінази.

Після сеансу гемодіалізу у хворих на хронічну ниркову недостатність різко знижується активність iNOS і eNOS, зменшується вміст ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона в лізаті лімфоцитів.

## Список літератури

- Алейникова ТЛ, Рубцова ГВ. Руководство к практическим занятиям по биохимии. М.: Высш. шк.; 2000. 239 с. (Aleinikova TL, Rubtsova GV. A guide to practical exercises in biochemistry. M.: Higher school; 2000. 239 p.).
- Гоженко АІ, Сусла ОБ, Клим АА, Яремчук ОЗ. Вплив сеансу гемодіалізу на структурно-функціональний стан ендотелію у хворих із термінальною нирковою недостатністю. Український журнал нефрології та діалізу. 2013;3(39):102–107 (Gozhenko AI, Susla OB, Klim AA, Yaremchuk OZ. Injecting a hemodialysis session on the structural and functional endothelium of the ailments due to the thermal deficiency. Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis. 2013;3(39):102-107).
- Дудар ІО, Лобода ОМ, Король ЛВ, Алексеєва ВВ. Прогресування хронічної хвороби нирок: стан оксидантного стресу на різних стадіях ХНН. Український журнал нефрології та діалізу. 2012;2(34):18–24 (Dudar IO, Loboda OM,

- Korol LV, Alekseeva VV. The progression of chronic kidney disease: state of oxidative stress at different stages of chronic kidney disease. *Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis*. 2012;2(34):18-24).
4. Іваночко РБ, Склярів ОЯ. Стан системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах крові хворих з хронічною нирковою недостатністю до та після сеансу гемодіалізу. *Медична біохімія*. 2014;16(2):26-30 (Ivanochko RB, Sklyarov OYa. 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. *Medical Chemistry*. 2014;16(2):26-30).
  5. Іваночко РБ. 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 квіт. 2015 р.)*. К.; 2015. С. 29 (Ivanochko RB. Injecting a hemodialysis session on the NO-synthase / arginase system and oxidative processes in lymphocytes in ailments with chronic nircovymic deficiency before the hemodialysis session. *Actual problems of biochemistry and biotechnology - 2015: abstracts add. conference-competition for young students (Kyiv, 23-24 April 2015)*. Kyiv; 2015. P. 29).
  6. Іваночко РБ. Зміни показників системи NO-синтаза/аргіназа і оксидативних процесів у лімфоцитах хворих, які отримують замісну ниркову терапію. 3-тя міжнар. наук. конф. «Актуальні проблеми сучасної біохімії та клітинної біології» (м. Дніпропетровськ, 24-25 верес. 2015 р.). Дніпропетровськ: Арбуз; 2015. С. 122-123 (Ivanochko RB. Changes in indicators of the NO-synthase / arginase system and oxidative processes in lymphocytes with ailments, which will be recognized as a substitute for nirk therapy. *Third International Science Conference «Actual problems of the current biochemistry and psychology»*. Dnipropetrovsk; 2015. P. 122-123).
  7. Іваночко РБ, Білецька ЛП, Склярів ОЯ. 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. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2014;65(1):66-70 (Ivanochko RB, Biletska LP, Sklyarov OYa. Changes of indices of L-arginine/nitric oxide/arginase and oxidative processes in blood plasma in patients with chronic renal insufficiency before and after hemodialysis. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2014;65(1):66-70).
  8. Кіселик ІО, Луцик МД, Шевченко ЛЮ. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології. *Лабораторна діагностика*. 2001;3:43-45 (Kiselyk IO, Lutsyk MD, Shevchenko LYU. Features of determination of nitrates and nitrites in peripheral blood in patients with viral hepatitis and jaundice syndrome of other etiology. *Laboratory Diagnostics Journal*. 2001;3:43-45).
  9. Королюк МА, Іванова Д, Майорова І. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*. 1988;1:16-18 (Korolyuk MA, Ivanova D, Mayorova I. Method for determining the activity of catalase. *Laboratory Work*. 1988;1:16-18).
  10. Король ЛВ, Степанова НМ, Лавренюк ОВ., Мігаль ЛЯ. Вікові особливості оксидативного стресу у пацієнтів з пієлонефритом. *Український журнал нефрології та діалізу*. 2018;3(59):44-49 (Korol LV, Stepanova NM, Lavrenchuk OV, Migal LYa. Age-related oxidative stress in patients with pyelonephritis. *Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis*. 2018;3(59):44-49).
  11. Мойн ВМ. Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах. *Лабораторное дело*. 1986;12:724-727 (Moin VM. A simple and specific method for determining the activity of glutathione peroxidase in erythrocytes. *Laboratory Work*. 1986;12:724-727).
  12. Смирнов АВ, Шилов ЕМ, Добронравов ВА, Каюков ИГ, Бобкова ИН, Швецов МЮ и др. Национальные рекомендации. Хроническая болезнь почек: основные принципы скрининга, диагностики, профилактики и подходы к лечению. *Клиническая нефрология*. 2012;4:4-26 (Smirnov AV, Schilov EM, Dobronravov VA, Kayukov IG, Bobkova IN, Shevcefov MU et al. National recommendations. Chronic illness of kidneys: main principles of screening, diagnostics, preventive maintenance and approaches to treatment. *Clinical Nephrology*. 2012;4:4-26).
  13. Сумбаев ВВ, Ясинская ИМ. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс. *Современные проблемы токсикологии*. 2000;3:3-7 (Sumbayev VV, Yasinskaya IM. DDT effect on rat liver, lungs and brain nitric oxide synthase activity. *Ukrainian Journal of Modern Problems of Toxicology*. 2000;3:3-7).
  14. Тимурбулатов МА, Селезнев ЕИ. Метод повышения свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение. *Лабораторное дело*. 1981;4:209-211 (Timurbulatov MA, Seleznev EI. Method for increasing free radical oxidation of lipid-containing blood components and its diagnostic value. *Laboratory Work*. 1981;4:209-211).
  15. Топчий ИИ, Кириенко АН., Бондарь ТН Лесовая АВ, Щенявская ЕН. Перекисное окисление липидов и метаболизм оксида азота у больных хронической болезнью почек в динамике лечения. *Український журнал нефрології та діалізу*. 2012;1(33):3-8 (Topchii II, Kirienko AN, Bondar TN, Lesovaja AV, Schenyavskaya EN. Lipid peroxidation and nitric oxide metabolism at patients with chronic kidney disease in the dynamics of treatment. *Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis*. 2012;1(33):3-8).
  16. Чевари С, Андял Т, Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте. *Лабораторное дело*. 1991;10:9-13 (Chevari S, Andyal T, Strenger J. Determination of antioxidant blood parameters and their diagnostic value in old age. *Laboratory Work*. 1991;10:9-13).
  17. Шпаков АЕ. К методике раздельного определения общей, редуцированной и дегидроаскорбиновой кислот. *Лабораторное дело*. 1967;5:305-306 (Shpakov AE. To the method of separate determination of total, reduced and dehydroascorbic acids. *Laboratory Work*. 1967;5:305-306).
  18. Barathi S, Vadhana P et al. Estimation of hydrogen sulphide in the human lymphocytes. *Indian J Biochem Biophys*. 2007;44(3):179-182.
  19. Boelaert J, Schepers E, Glorieux G et al. Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine in Serum from Patients with Chronic Kidney Disease: UPLC-MS/MS versus ELISA. *Toxins (Basel)*. 2016;13(8):E149.
  20. Bogdan C. Regulation of lymphocytes by nitric oxide. *Methods Mol Biol*. 2011;677:375-393.
  21. Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*. 1982;60:618-622.

22. Busch M, Fleck C et al. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease - possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids*. 2006;30(3):225-232.
23. de Jager DJ, Grootendorst DC, Jager KJ et al. Cardiovascular and noncardiovascular mortality among patients starting dialysis. *JAMA*. 2009;302(16):1782-1789.
24. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286(4):678-685.
25. Filipovic MR, Miljkovic JL, Nauser T et al. Chemical characterization of the smallest S-nitrosothiol, HSNO; cellular cross-talk of H<sub>2</sub>S and S-nitrosothiols. *J Am Chem Soc*. 2012;134(29):12016-12027.
26. Geyer JW, Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Ann Biochem*. 1971;39(2):412-417.
27. Green LC, David AW. Analysis of nitrate, nitrite and (1515) nitrate in biological fluids. *Ann Biochem*. 1982;126:131-138.
28. Kao MP, Ang DS et al. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. *J Hum Hypertens*. 2010;24(1):1-8.
29. Kashem A, Endoh M, Yano N et al. Expression of inducible-NOS in human glomerulonephritis: the possible source is infiltrating monocytes/macrophages. *Kidney Int*. 1996;50(2):392-399.
30. 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;282(45):32719-32729.
31. Lee DM, Jackson KW, Knowlton N. Oxidative stress and inflammation in renal patients and healthy subjects. *PLoS One*. 2011;6(7):e22360.
32. Meenakshi SR, Agarwal R. Nitric oxide levels in patients with chronic renal disease. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(7):1288-1290.
33. Miller TW, Wang EA, Gould S et al. Hydrogen sulfide is an endogenous potentiator of T cell activation. *J Biol Chem*. 2012;287(6):4211-4221.
34. Moens AL, Yang R et al. Beta 3-adrenoreceptor regulation of nitric oxide in the cardiovascular system. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(6):1088-1095.
35. Schwedhelm E, Böger RH. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7(5):275-285.
36. Small DM, Coombes JS, Bennett N et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(4):311-321.
37. Sztanek F, Molnárné Molnár A, Balogh Z. The role of oxidative stress in the development of diabetic neuropathy. *Orv Hetil*. 2016;157(49):1939-1946.
38. Wang W, Feng S-J, Li H et al. Correlation of Lower Concentrations of Hydrogen Sulfide with Activation of Protein Kinase C $\beta$ II in Uremic Accelerated Atherosclerosis Patients. *Chinese Medical Journal*. 2015;128(11):1465-1470.
39. Zaichko NV, Melnik AV, Yoltukhivskyy MM et al. Hydrogen sulfide: modern aspects of metabolism, biological and medical role. *Ukr Biochem J*. 2014;86(5):5-25.
40. Zhou TB, Yin SS. Association of endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism with the risk of end-stage renal disease. *Ren Fail*. 2013;35(4):573-578.

Стаття надійшла до редакції журналу 23.07.2020 р.

#### Конфлікт інтересів

Автори цієї статті стверджують, що конфлікту інтересів немає.

## Особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативних процесів у хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю внаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу

**Р. Б. Іваночко, О. О. Абрагамович, І. В. Кравчук**

**Вступ.** Останнім часом значну увагу приділяють вивченню зв'язку між хронічною хворобою нирок (ХХН) і виникненням різноманітних ускладнень, які супроводжуються змінами системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативним стресом.

За хронічної ниркової недостатності (ХНН) активація пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та порушення в системі L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа інтегровані в механізми формування ендотеліальної дисфункції, гіпертензії, збільшення вмісту циркулювальних цитокінів у крові, порушення функціонального стану тромбоцитів.

**Мета.** З'ясувати особливості функціонального стану системи L-аргінін/NO-синтаза/аргіназа та оксидативних процесів у хворих із термінальною хронічною нирковою недостатністю внаслідок хронічного гломерулонефриту до і після сеансу гемодіалізу.

**Матеріали й методи.** Після отримання письмової згоди на проведення обстеження відповідно до принципів Гельсінкської декларації прав людини, Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину, відповідних законів України та міжнародних актів, а також погодження з Етичною комісією Львівського національного медичного університету (ЛНМУ) імені Данила Галицького, у дослідження, яке проводили в Комунальному некомерційному підприємстві (КНП) Львівської обласної ради (ЛОР) «Львівська обласна клінічна лікарня», у рандомізований спосіб із попередньою стратифікацією за наявністю у хворих ХХН (хронічний гломерулонефрит) із термінальною ХНН, діагностованої згідно з наказом МОЗ і НАМН України № 280/44 від 11.05.2011 р. «Про затвердження стандарту та уніфікованих клінічних протоколів надання медичної допомоги зі спеціальності «нефрологія») та Рекомендаціями щодо поліпшення якості діагностики та лікування хвороб нирок від 2002 р. – Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) та 2012 р. – Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), у дослідження залучено 42 хворих (22 жінки (52,38 %), 20 чоловіків (47,62 %), середній вік 56 років), яких лікували методом гемодіалізу (ГД) (тричі на тиждень по чотири години з використанням синтетичних діалізаторів і бікарбонатного буфера). Контрольну групу (КГ) склали 20 умовно здорових, зіставлених за статтю і віком людей.

**Результати.** У хворих із термінальною ХНН фіксували зменшений вміст L-аргініну (на 33,0 % ( $p < 0,01$ ) і 31,0 % ( $p < 0,01$ ) відповідно) порівняно з референтними показниками у КГ. Після сеансу ГД вміст L-аргініну в плазмі крові зменшувався на 20,0 %, у лізаті лімфоцитів – на 30,0 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками у хворих до сеансу ГД.

До сеансу ГД вміст  $H_2S$  у плазмі крові зменшувався – на 23,0 % ( $p < 0,01$ ), у лізаті лімфоцитів суттєво не відрізнявся від показників вмісту у плазмі крові у КГ. Після сеансу ГД вміст  $H_2S$  у плазмі крові зменшувався на 12,0 % ( $p < 0,05$ ), у лізаті лімфоцитів – на 23,0 % ( $p < 0,05$ ).

До сеансу концентрація АДМА у плазмі крові хворих була у 2,3 разу ( $p < 0,01$ ), а концентрація СДМА – у 3,4 разу ( $p < 0,01$ ) вища, ніж у крові донорів. Після сеансу ГД концентрація АДМА і СДМА в плазмі крові знизилася на 49,0 % ( $p < 0,05$ ) і 48,0 % ( $p < 0,05$ ) відповідно.

Активність iNOS зростала у 15 разів ( $p < 0,01$ ), активність eNOS знижувалася на 70,0 % ( $p < 0,05$ ). Після сеансу ГД різко знижувалася активність iNOS (у 14 разів,  $p < 0,01$ ) і eNOS (у 8 разів,  $p < 0,01$ ).

Активність аргінази в плазмі крові хворих була вища на 33,0 %, ніж у групи донорів. До сеансу ГД активність аргінази у лімфоцитах хворих була невірогідно нижча (на 14,0 %,  $p > 0,05$ ), ніж у КГ, після сеансу ГД активність аргінази зростала.

До сеансу ГД вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові хворих був більшим на 34,0 % ( $p < 0,05$ ), вміст oxLDL і активність мієлопероксидази не змінювались порівняно з показниками КГ. Після сеансу ГД вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові зменшився на 14,0 % ( $p < 0,05$ ), активність мієлопероксидази була нижча від контрольних значень.

До сеансу ГД активність СОД, каталази та ГПО достовірно не відрізнялась від показників у КГ. Після сеансу ГД активність каталази була достовірно знижена ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками контролю.

Уміст вітаміну С, загальної та окисненої форм, зменшувався на 45,0 % ( $p < 0,05$ ) і на 19,0 % ( $p < 0,05$ ) відповідно порівняно з показниками донорів. Після сеансу ГД концентрація загальної форми вітаміну С знижувалася на 27,0 % ( $p < 0,05$ ), окисненої форми – на 25,0 % ( $p < 0,05$ ) порівняно з показниками до сеансу ГД.

У лізаті лімфоцитів у хворих із ХНН вміст ТБК-активних продуктів зростав на 23,0 % ( $p < 0,05$ ). Порівнюючи зміни вмісту ТБК-активних продуктів у плазмі крові та лізаті лімфоцитів у хворих із ХНН, слід зазначити, що у лімфоцитах вміст ТБК-активних продуктів зростав лише на 23,0 %, тоді як у плазмі крові на 33,0 % ( $p < 0,05$ ), однак у плазмі крові вміст ТБК-активних продуктів був у 3,4 разу більшим, ніж у лімфоцитах. Після гемодіалізу вміст ТБК-активних продуктів у лімфоцитах зменшився на 22,0 % ( $p < 0,05$ ), а в плазмі крові на – 15,0 % ( $p < 0,05$ ).

Активність СОД і каталази в лізаті лімфоцитів хворих із ХНН, порівняно з показниками в КГ, була нижча (на 19,0 і 44,0 %,  $p < 0,05$ , відповідно), активність ГПО виразно не змінювалась. Слід зазначити, що активність СОД і каталази у плазмі крові до ГД була вища, ніж у лімфоцитах ( $p < 0,05$ ).

Після сеансу ГД, порівняно з показниками до сеансу ГД активність СОД і глутатіонпероксидази в лізаті лімфоцитів достовірно не змінювалась, активність каталази знижувалася.

**Висновки.** Сеанс гемодіалізу у хворих на хронічну ниркову недостатність спричиняє різке зниження активності iNOS та eNOS, зменшення вмісту ТБК-активних продуктів, L-аргініну та нітрит-аніона в лізаті лімфоцитів.

**Ключові слова:** хронічна хвороба нирок, гемодіаліз, NO-синтаза, L-аргінін, аргіназа, пероксидне окиснення ліпідів, вітамін С.

## Features of the Functional State of the L-arginine / NO-synthase / Arginase System and Oxidative Processes in Patients with end-stage Renal Disease due to Chronic Glomerulonephritis Before and After a Hemodialysis Session

R. Ivanochko, O. Abrahamovych, I. Kravchuk

**Introduction.** Recently, much attention has been paid to the study of the relationship between chronic kidney disease (CKD) and the occurrence of various complications, which are accompanied by changes in the L-arginine / NO-synthase / arginase system and oxidative stress.

In chronic renal failure (CRF), activation of lipid peroxidation (LPO) and disorders in the L-arginine / NO-synthase / arginase system are integrated into the mechanisms of endothelial dysfunction, hypertension, increased circulating cytokine content in the blood, dysfunction.

**The aim of the study.** To find out the features of the functional state of the L-arginine / NO-synthase / arginase system and oxidative processes in patients with end-stage renal disease due to chronic glomerulonephritis before and after a hemodialysis session.

**Materials and methods.** After obtaining written consent the survey agreed by the Ethics Commission of Danylo Halytsky Lviv National Medical University (LNMU) in accordance with the principles of the Helsinki Declaration of Human Rights, the Council of Europe Convention on Human Rights and Biomedicine, relevant laws of Ukraine and international acts was conducted in the Municipal Non-Profit Enterprise (MCP) of the Lviv Regional Council (ENT) «Lviv Regional Clinical Hospital». In a randomized manner with preliminary stratification by the presence of CKD (chronic glomerulonephritis) with terminal CRF diagnosed according to the Order of the Ministry of Health of Ukraine. 280/44 of 11.05.2011 (On approval of the standard and unified clinical protocols for medical care in the specialty «Nephrology») and Recommendations for improving the quality of diagnosis and treatment of kidney disease (2002) - Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) and 2012 - Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO), treated with hemodialysis (HD) (3 times a week for four hours using synthetic dialyzers and bicarbonate buffer), 42 patients (22 women (52.38 %), 20 men), 62,00 %), whose average age was 56 years) were involved to the study. The control group (CG) consisted of 20 relatively healthy, comparable in gender and age volunteers.

**Results.** The content of L-arginine in the patients with terminal CRF, was reduced (by 33.0 % ( $p < 0.01$ ) and 31.0 % ( $p < 0.01$ ), respectively) compared with the reference values of CG. After the HD session, the content of L-arginine in blood plasma decreased by 20.0 %, in lymphocyte lysate - by 30.0 % ( $p < 0.05$ ) compared with patients before the HD session.

Before the HD session, the content of  $H_2S$  in blood plasma decreased by 23.0 % ( $p < 0.01$ ), the content of  $H_2S$  in lysate did not differ significantly from that in CG of donors and its content in blood plasma. After the HD session, its content in blood plasma decreased by 12.0 % ( $p < 0.05$ ), in lymphocyte lysate - by 23.0 % ( $p < 0.05$ ).

The plasma concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) was 2.3 times higher ( $p < 0.01$ ), and the concentration of symmetric dimethylarginine (SDMA) was 3.4 times ( $p < 0.01$ ) than in the blood of donors. After the HD session, plasma ADMA and SDMA concentrations decreased by 49.0 % ( $p < 0.05$ ) and 48.0 % ( $p < 0.05$ ), respectively.

The activity of iNOS increased 15-fold ( $p < 0.01$ ), and eNOS activity decreased by 70.0 % ( $p < 0.05$ ). After the HD session, iNOS activity increased (14 times,  $p < 0.01$ ) as well as eNOS activity (8 times,  $p < 0.01$ ).

Plasma arginase activity was 33.0 % higher than in the CG. The arginase activity in lymphocytes was incredibly lower (by 14.0 %,  $p > 0.05$ ) before the HD session, compared with the CG, arginase activity after the HD session tended to increase.

The content of thiobarbituric acid (TBA)-active products in plasma prior to the HD session, was higher by 34.0 % ( $p < 0.05$ ), oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) content and myeloperoxidase activity did not change. After the HD session, the content of TBA-active products in blood plasma decreased by 14.0 % ( $p < 0.05$ ), myeloperoxidase activity was below the normal values.

The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase prior to the HD session, did not differ significantly compared with the CG. After the HD session, catalase activity was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) compared with controls.

Vitamin C, its total and oxidized forms, decreased by 45.0 % ( $p < 0.05$ ) and 19.0 % ( $p < 0.05$ ), respectively, compared with the CG. After the HD session, the concentration of vitamin C in total decreased by 27.0 % ( $p < 0.05$ ), oxidized form - by 25.0 % ( $p < 0.05$ ), compared with the indicators before the HD session.

The content of TBA-active products in the lysate of lymphocytes in patients with CRF, increased by 23.0 % ( $p < 0.05$ ). Comparing the changes of the TBA-active products content in blood plasma and lymphocyte lysate in patients with CRF, it should be noted that the content of TBA-active products in lymphocytes increased slightly (by



23.0 %), while in blood plasma by 33.0 % ( $p < 0.05$ ), however, the content of TBA-active products in the blood plasma was 3.4 times higher than in lymphocytes. The content of TBA-active products after HD in lymphocytes decreased by 22.0 % ( $p < 0.05$ ) and in blood plasma - by 15.0 % ( $p < 0.05$ ).

The activity of SOD and catalase in the lymphocyte lysate in patients with CRF was lower (by 19.0 and 44.0 %,  $p < 0.05$ , respectively) compared with the control group, the activity of glutathione peroxidase did not change significantly. It should be noted that the activity of SOD and catalase before HD in blood plasma was higher than in lymphocytes ( $p < 0.05$ ).

The activity of SOD and glutathione peroxidase in the lymphocyte lysate after the HD session, did not change significantly in comparison with the indicators before the HD session, the catalase activity tended to decrease.

**Conclusions.** A hemodialysis session in patients with chronic renal failure causes sharp decrease of the iNOS and eNOS activity, decrease of the content of thiobarbituric acid-active products, L-arginine and nitrite anion in the lymphocyte lysate.

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

### Інформація про авторів

1. Іваночко Руслана Богданівна; КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня», відділ госпітальної нефрології та гемодіалізу (81555, Львівська обл., Городоцький район, смт Великий Любінь, вул. Львівська 64), кандидат медичних наук, лікар-нефролог; м. Львів, вул. М. Кричевського 67; +3(096) 226-00-64; [guslana.ivanochko07@gmail.com](mailto:guslana.ivanochko07@gmail.com); <https://orcid.org/0000-0002-6211-6661>.
2. Абрагамович Орест Остапович; Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра внутрішньої медицини №1 (79010, м. Львів, вул. Пекарська 69; +38 (032) 276-97-63), доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри; 79034, м. Львів, вул. Литовська 8; +38(050) 665-29-95, +38(032)270-44-20; [docorest@gmail.com](mailto:docorest@gmail.com); <http://orcid.org/0000-0001-6862-6809>.
3. Кравчук Ігор Володимирович; КНП ЛОР «Львівська обласна клінічна лікарня», 3-й хірургічний відділ (81555, Львівська обл., Городоцький район, смт Великий Любінь, вул. Львівська 64), лікар-хірург; м. Львів, вул. М. Кричевського 67; +3(067) 670-00-83.