

## АКТИВНІСТЬ ІНДУЦИБЕЛЬНОЇ NO-СИНТАЗИ ТА ВМІСТ ЦИТРУЛІНУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЯК МАРКЕРИ ІМУНОЗАПАЛЬНОЇ АКТИВАЦІЇ ТА ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ ПРИ ХРОНІЧНІЙ СЕРЦЕВІЙ НЕДОСТАТНОСТІ

**Активність індукційної No-синтази та вміст цитруліну в сироватці крові як маркери імунізапальної активації та оксидативного стресу при хронічній серцевій недостатності**

Н. Г. Ліпкан<sup>1,2</sup>, О. Б. Кучменко<sup>1</sup>, Л. С. Мхітарян<sup>1</sup>

Ніжинський державний університет імені Миколи Гоголя<sup>1</sup>

ДУ «Національний науковий центр «Інститут кардіології імені М. Д. Стражеска НАМН України»<sup>2</sup>

**Резюме.** Оксид азоту (NO) є потужним ендотеліо-розслаблювальним фактором, що викликає розслаблення гладких м'язів судин, пригнічує їх проліферацію, бере участь у регуляції системного та легеневого судинного опору, процесів агрегації тромбоцитів, зсідання крові тощо.

**Мета дослідження** – вивчити активність iNOS, показників імунізапальної реакції та інтенсивності оксидативного стресу при хронічній серцевій недостатності (ХСН).

**Матеріали і методи.** Дослідження виконано на базі відділення серцевої недостатності ДУ ННЦ «Інститут кардіології імені акад. М. Д. Стражеска НАМН України». Обстежено 120 пацієнтів із ХСН обох статей у віці (63±3,4) року, з них 76 з ішемічною хворобою серця (ІХС) та 44 – із гіпертонічною хворобою (ГХ). Критеріями залучення пацієнтів у дослідження були: 1) ХСН II–IV функціональних класів за NYHA із СД ЛШ (фракція викиду (ФВ) ЛШ ≤45 %); 2) вік ≤75 років. Критеріями виключення в дослідження були: 1) вік >75 років; 2) ФВ ЛШ ≥45 % за даними ехокардіографічного дослідження; 3) ХСН як наслідок клапанних вад, запальних захворювань серця; 4) гіпертрофічна та рестриктивна кардіоміопатії; 5) гостра ішемічна хвороба серця; 6) перенесений інсульт або транзиторна ішемічна атака давністю <6 місяців; 7) онкологічні захворювання; 8) гострі інфекційні захворювання. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакета прикладних програм Statistica for Windows. Достовірність відмінностей між кількісними ознаками із нормальним розподілом проводили за допомогою непарного t-критерію Стьюдента. При порівнянні двох незалежних груп використовувався критерій Манна – Уїтні (U) та критерій Вілкоксона (W) для двох залежних груп, якщо розподіл показника не відповідав нормальному. Різницю вважали статистично достовірною при  $p < 0,05$ .

©Н. Г. Ліпкан та ін., 2021

**Inductive No-synthase activity and citrulline content in blood serum as markers of immuno-inflammatory activation and oxidative stress under chronic heart failure**

N. G. Lipkan<sup>1,2</sup>, O. B. Kuchmenko<sup>1</sup>, L. S. Mkhitarian<sup>1</sup>

M. Hohol Nizhyn State University<sup>1</sup>,

National Scientific Center M. D. Strazhesko Institute of Cardiology of the National Academy of Medical Sciences<sup>2</sup>

e-mail: kuchmed@yahoo.com

**Summary.** Nitric oxide (NO) is a powerful endothelium-relaxing factor that causes vascular smooth muscle relaxation, inhibits their proliferation, and participates in the regulation of systemic and pulmonary vascular resistance, platelet aggregation processes, blood clotting and more.

**The aim of the study** – to investigate iNOS activity, immunoinflammatory response and oxidative stress intensity in chronic heart failure (CHF).

**Materials and Methods.** The study was performed on the basis of the Department of Heart Failure of the Institute of Cardiology named after Acad. M. D. Strazhesk, National Academy of Medical Sciences of Ukraine. 120 patients with CHF of both sexes aged (63±3.4) were examined, 76 of them with coronary heart disease (CHD) and 44 with hypertension. The criteria for involving patients in the study were: 1) CHF class II-IV according to NYHA with LV HF (ejection fraction (EF) of LV ≤45 %); 2) age ≤75 years. Exclusion criteria for the study were: 1) age > 75 years; 2) LV EF ≥45% according to echocardiographic examination; 3) CHF as a consequence of valve defects, inflammatory heart disease; 4) hypertrophic and restrictive cardiomyopathy; 5) acute coronary heart disease; 6) suffered a stroke or transient ischemic attack <6 months old; 7) oncological diseases; 8) acute infectious diseases. Statistical processing of the results was performed using the application package Statistica for Windows. Significance of differences between quantitative traits with normal distribution was performed using the odd Student's t-test. When comparing the two independent groups, the Mann-Whitney test (U) and the Wilcoxon test (W) were used for the two independent groups if the distribution of the indicator did not correspond to normal. The difference was considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

**Results.** We examined 120 patients with CHF of both sexes aged (63±3.4), including 76 with coronary heart

**Результати.** Обстежено 120 пацієнтів із ХСН обох статей у віці ( $63 \pm 3,4$ ) року, з них 76 з ішемічною хворобою серця та 44 – із гіпертонічною хворобою. В результаті досліджень продемонстровано, що за ХСН спостерігається формування оксидативного стресу, на що вказує зростання вмісту продуктів окиснення ліпідів, білків у сироватці крові та в ліпопротеїнових фракціях. Інтенсифікація вільнорадикальних окиснювальних процесів відбувається на фоні значного пригнічення активності антиоксидантних систем захисту – каталази та супероксиддисмутази. Разом з цим спостерігається зниження рівня відновленого глутатіону й активності параоксонази-1. На наявність імунізапальної активації вказує зростання у 2 рази вмісту в сироватці крові церулоплазмину та прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ФНП- $\alpha$ . Результати НСТ-тесту з імункомпетентними клітинами свідчать про збільшення фагоцитарної активності клітин в умовах системної запальної реакції. Підвищення активності ферменту мієлопероксидази в 2 рази у крові обстежуваних пацієнтів також слугує доказом активності нейтрофілів та моноцитів в умовах системної запальної реакції. Вказані зміни імуніохімічних показників супроводжувались підвищенням загального вмісту цитруліну в сироватці крові в 2 та більше разів. Це може бути результатом надмірної активації індукційної ізоформи NO-синтази в умовах запальної реакції та під впливом підвищеного рівня прозапальних цитокінів. Активність ізоформи iNOS в цих умовах виявилася підвищеною в 3 рази.

**Висновки.** У взаємозв'язку між системною імунною активацією та інтенсивністю оксидативного стресу важливою зв'язувальною ланкою можна вважати активацію iNOS у клітинах крові та серцево-судинної системи. У зв'язку з цим активність iNOS та підвищення рівня цитруліну в циркулюючій крові можуть вважатися маркерами наявності імунної активації та оксидативного стресу, які зумовлюють прогресування основного серцево-судинного захворювання та ХСН.

**Ключові слова:** хронічна серцева недостатність; індукційна NO-синтаза; цитрулін.

## ВСТУП

Загальновідома роль оксиду азоту (NO) як потужного ендотеліорозслаблювального фактора, що викликає розслаблення гладких м'язів судин, пригнічує їх проліферацію, бере участь у регуляції системного та легеневого судинного опору, процесів агрегації тромбоцитів, зсідання крові тощо [1–3].

NO синтезується з молекули амінокислоти аргініну під впливом ферментної системи NO-синтази. В результаті біохімічної реакції утворюються 2 кінцевих продукти – NO та цитрулін в еквівалентному співвідношенні 1:1 [4–7].

NO-синтазна система в організмі представлена у вигляді трьох ізоформ: ендотеліальної, індукційної (в імункомпетентних клітинах, кардіоміоцитах та клітинах судинної стінки) та нейрональної

disease and 44 with arterial hypertension. Studies have shown that the formation of oxidative stress is observed in CHF, as indicated by an increase in the content of oxidation products of lipids, proteins in serum and lipoprotein fractions. Intensification of free radical oxidative processes occurs against the background of significant inhibition of the activity of antioxidant defense systems – catalase and superoxide dismutase. At the same time, there is a decrease in the level of reduced glutathione and paraoxonase-1 activity. The presence of immunoinflammatory activation is indicated by a doubling of serum ceruloplasmin and proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ . The results of the NBT-test with immunocompetent cells indicate an increase in phagocytic activity of cells in a systemic inflammatory response. The doubling of the activity of the enzyme myeloperoxidase in the blood of the examined patients also serves as evidence of the activity of neutrophils and monocytes in the systemic inflammatory response. These changes in immuno-biochemical parameters were accompanied by an increase in the total content of citrulline in the serum by two or more times. This may be the result of excessive activation of the inducible isoform of NO-synthase under conditions of inflammatory reaction and under the influence of elevated levels of proinflammatory cytokines. The activity of the iNOS isoform under these conditions was increased threefold.

**Conclusions.** In the relationship between systemic immune activation and the intensity of oxidative stress, activation of iNOS in blood cells and the cardiovascular system can be considered an important link. Therefore, iNOS activity and increased circulating levels of citrulline can be considered markers of immune activation and oxidative stress, which cause the progression of underlying cardiovascular disease and CHF.

**Key words:** chronic heart failure; iNO-synthase; citrulline.

NO-синтази (в клітинах нервової системи та скелетної мускулатури) [8, 9].

З метою характеристики функціонального стану NO-синтазних систем більшість дослідників застосовують спектрофотометричне визначення в сироватці крові загального вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту-NO<sub>2</sub>. Величину цього показника можна розглядати як інтегральну оцінку функціонального стану всіх трьох ізоформ цієї ферментної системи [7].

У клінічній практиці найбільш доступною для оцінки функціональної активності є індукційна NO-синтаза (iNOS), яка представлена в основному в клітинах крові, що беруть участь у розвитку імунізапальної реакції, яка відіграє важливу роль в ушкодженні клітин серця та судин, а також в прогресуванні патологічних змін у них. Застосування

такого підходу дослідження iNOS виправдано та важливо з точки зору встановлення наявності та ступеня активності імунзапальної реакції, її участі в формуванні оксидативного стресу.

**Метою дослідження** було вивчити активність iNOS, показників імунзапальної реакції та інтенсивності оксидативного стресу при хронічній серцевій недостатності (ХСН).

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дослідження виконано на базі відділення серцевої недостатності ДУ ННЦ «Інститут кардіології імені акад. М. Д. Стражеска НАМН України». Обстежено 120 пацієнтів із ХСН обох статей у віці ( $63 \pm 3,4$ ) року, з них 76 з ішемічною хворобою серця (ІХС) та 44 – із гіпертонічною хворобою (ГХ).

Критеріями залучення пацієнтів у дослідження були: 1) ХСН II–IV функціональних класів за NYHA із СД ЛШ (фракція викиду (ФВ) ЛШ  $\leq 45\%$ ); 2) вік  $\leq 75$  років. Критеріями виключення в дослідження були: 1) вік  $>75$  років; 2) ФВ ЛШ  $\geq 45\%$  за даними ехокардіографічного дослідження; 3) ХСН як наслідок клапанних вад, запальних захворювань серця; 4) гіпертрофічна та рестриктивна кардіоміопатія; 5) гостра ішемічна хвороба серця; 6) перенесений інсульт або транзиторна ішемічна атака давністю  $<6$  місяців; 7) онкологічні захворювання; 8) гострі інфекційні захворювання.

Діагноз основного захворювання визначали на підставі загальноклінічного обстеження та відповідних інструментальних і лабораторних методів згідно з чинними рекомендаціями з діагностики та лікування серцевої недостатності Європейського товариства кардіологів та відповідними рекомендаціями Асоціації кардіологів України. Пацієнтів включали в дослідження у фазу клінічної стабілізації.

Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб зівставного віку: 13 (65%) чоловіків та 7 (35%) жінок із медіаною віку 52,15 (41,5–65,0) року.

Обов'язкові методи обстеження пацієнтів включали: ехокардіографію за стандартною методикою, електрокардіографію у 12 відведеннях, стандартні лабораторні аналізи (загальноклінічні та біохімічні) відповідно до чинних стандартів діагностики.

Кров для дослідження брали з ліктьової вени зранку натще до початку курсу лікування. Для оцінки інтенсивності вільнорадикальних окиснювальних процесів у сироватці крові спектрофотометрично визначали вміст продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів – дієнових кон'югатів (ДК) [10] та ТБК-позитивних продуктів (ТБК-ПП) [11]. Вміст продуктів вільнорадикального окиснення білків сироватки крові та ліпопротеїнових фракцій – 1,4-динітрофенілгідразонів (ПВРОБ) [12]. Індекс переокисної модифікації атерогенних ліпопротеїнів визначали за накопиченням у них продуктів окиснення ліпідів

за методом [13]. Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю каталази, супероксиддисмутази, параоксонази-1 [14–16], а також за рівнем відновленого глутатіону в сироватці крові [17].

Для оцінки наявності та активності системної імунзапальної реакції у сироватці крові методом імунферментного аналізу з використанням тест-систем визначали рівень прозапальних цитокінів – інтерлейкіну-6 (IL-6) (Labsystems iEMS, Фінляндія) та фактора некрозу пухлин- $\alpha$  (ФНП- $\alpha$ ) (Labsystems iEMS, Фінляндія). Функціональний стан імункомпетентних клітин (моноцитів) оцінювали за їх здатністю до відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест) в спонтанному тесті, а також при індукуванні пірогенами із визначенням резервних можливостей клітин. Результати НСТ-тесту оцінювали морфологічно у мазках. Вміст білка гострої фази запалення церулоплазміну визначали за методом [18]; активність ферменту мієлопероксидази вимірювали спектрофотометрично за методом [19]. Активність ізоферменту iNOS визначали за запропонованою нами методикою [20], сутність якої полягає в тому, що після отримання популяції мононуклеарних клітин периферійної крові в стерильні флакони з інкубаційним середовищем вносять 1 мл клітинної суміші з розрахунку  $3 \cdot 10^9$  клітин та інкубують протягом 24 год при температурі 37 °С. Після центрифугування інкубованої суміші в супернатанті спектрофотометрично визначають вміст цитруліну [21].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Statistica for Windows. Достовірність відмінностей між кількісними ознаками із нормальним розподілом проводили за допомогою непарного t-критерію Стьюдента. При порівнянні двох незалежних груп використовувався критерій Манна – Уїтні (U) та критерій Вілкоксона (W) для двох залежних груп, якщо розподіл показника не відповідав нормальному. Різницю вважали статистично достовірною при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Як показали проведені дослідження (табл. 1), за ХСН спостерігається формування оксидативного стресу, при цьому вільнорадикальному окисненню піддаються не тільки ліпіди, але й білки сироватки крові та ліпопротеїнів. Вміст ДК та ТБК-ПП в сироватці крові при ХСН виявились достовірно вищими на 64 та 59% відповідно порівняно з контролем. На 46% підвищений вміст кінцевих продуктів вільнорадикального окиснення білків. Вільнорадикальній окиснювальній модифікації піддаються також ЛПНГ та ЛПДНГ. На це вказує збільшення вмісту ПВРОБ у сумарній фракції ЛПНГ+ЛПДНГ на 49% порівняно з контрольною групою. У результаті переокиснення ліпідних та білкових компонентів ліпопротеїнів крові ступінь їх переокисної модифікації достовірно збільшується з  $2,41 \pm 0,70$  до  $3,78 \pm 0,11$  ( $p < 0,05$ ). Це

**Таблиця 1.** Показники інтенсивності вільнорадикальних окиснювальних реакцій та системного антиоксидантного захисту при хронічній серцевій недостатності,  $M \pm m$ 

Показник	Контрольна група (n=20)	Хронічна серцева недостатність (n=120)
Дієнові кон'югати, Од/л	1,78±0,13	2,80±0,23*
ТБК-ПП, Од/л	5,11±0,21	8,12±0,63*
ПВРОБ у сироватці крові, ум. од./мл	4,13±0,16	6,01±0,19*
ПВРОБ в ЛПНГ+ЛПДНГ, ум.од./мг ліпідів	0,57±0,05	0,86±0,04*
Індекс перекисної модифікації ЛПНГ+ЛПДНГ, ум. од./мг ліпідів	2,41±0,70	3,78±0,11*
Активність каталази, Од/л	12,43±1,30	8,99±0,60*
Активність СОД, Од/л	1457,34±113,54	975,56±103,38*
Активність параоксонази-1, кУ/л	5,66±0,93	3,50±0,41*
Відновлений глутатіон, мкмоль/л	6,75±0,79	4,61±0,52*

Примітка: \* – різниця достовірна порівняно з контрольною групою ( $p < 0,05$ ).

вказує на зростання атерогенного потенціалу крові при ХСН, яке може відігравати ключову роль у прогресуванні основного захворювання та розвитку життєво небезпечних ускладнень.

Інтенсифікація вільнорадикальних окиснювальних процесів відбувається на фоні значного пригнічення активності антиоксидантних систем захисту – каталази (на 37 %) та СОД (на 50 %) порівняно з контрольною групою. Звертає увагу також зниження рівня відновленого глутатіону на 34 % і активності одного з найважливіших антиоксидантних ферментів – параоксонази-1 на 38 % порівняно з контрольною групою. Відомо, що параоксоназа-1 бере участь у регуляції метаболізму ліпідів, підтриманні структурної стабільності та захисті ЛПВГ та ЛПНГ від переокиснення, таким чином, зменшуючи ризик розвитку та прогресування ушкоджень судинної стінки. Параоксоназа-1 здатна руйнувати холестеринові та фосфоліпідні ефіри у складі окиснених ліпопротеїнів, виявляючи антиоксидантні властивості [22].

Показано, що зниження активності параоксонази-1 в сироватці крові супроводжується інтенсифікацією оксидативного стресу, а зростання активності цього ферменту асоціюється зі зниженням ризику розвитку оксидативного стресу та загрози розвитку

та прогресування серцево-судинних захворювань.

На наявність імунозапальної активації (табл. 2) вказувало зростання в 2 рази вмісту в сироватці крові вмісту білка гострої фази запалення церулоплазміну та прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ФНП- $\alpha$  відповідно на 41 та 59 % порівняно з контрольною групою.

Результати НСТ-тесту з імунокомпетентними клітинами, що характеризує інтенсивність внутрішньоклітинних кисенезалежних окиснювальних процесів з утворенням вільних радикалів, свідчить про збільшення фагоцитарної активності клітин на 40 % в умовах системної запальної реакції. Підвищення активності ферменту мієлопероксидази в 2 рази в крові обстежуваних пацієнтів також слугує доказом активності нейтрофілів та моноцитів в умовах системної запальної реакції та посиленого вивільнення в кровотік ферменту мієлопероксидази з азурофільних гранул імунокомпетентних клітин.

Вказані зміни імуно-біохімічних показників супроводжувались підвищенням загального вмісту цитруліну в сироватці крові в два та більше разів порівняно з контрольною групою. Це може бути результатом надмірної активації індукційної ізоформи NO-синтази в умовах запальної реакції та під

**Таблиця 2.** Показники імунозапальної активації та стану NO-синтазних систем при хронічній серцевій недостатності,  $M \pm m$ 

Показник	Контрольна група (n=20)	Хронічна серцева недостатність (n=120)
ІЛ-6, пг/мл	8,02±0,65	11,34±1,11*
ФНП- $\alpha$ , пг/мл	42,08±5,10	67,52±0,81*
НСТ спонт., %	8,50±0,78	17,01±1,60*
НСТ індук., %	16,12±0,48	19,24±2,12*
Активність мієлопероксидази, ум. од./хв	0,00242±0,0006	0,0057±0,0006*
Цитрулін у сироватці крові, мкмоль/л	21,14±2,63	49,06±5,60*
Активність iNOS, мкмоль/10 <sup>9</sup> клітин/год	41,14±0,53	123,26±13,20*
Церулоплазмін, мг/л	23,63±1,90	49,62±4,13*

Примітка: \* – різниця достовірна порівняно з контрольною групою ( $p < 0,05$ ).

впливом підвищеного рівня прозапальних цитокінів [23]. Активність ізоформи iNOS в цих умовах виявилася підвищеною в 3 рази порівняно з контрольним показником. Значне підвищення рівня цитруліну в сироватці крові та приріст активності iNOS в імункомпетентних клітинах при їх активації узгоджуються з існуючими даними літератури, які свідчать про потенційну здатність цієї ізоформи ферменту до багатократної активації в умовах імунозапальної реакції під впливом прозапальних цитокінів [1, 3, 23].

Таким чином, активація імункомпетентних клітин в умовах оксидативного стресу при ХСН супроводжується інтенсифікацією вільнорадикальних окиснювальних процесів у них на фоні пригнічення активності антиоксидантних систем захисту та накопиченням в крові активних форм кисню, продуктів вільнорадикальної модифікації ліпідів, білків, ферментів та кінцевих продуктів ферментних реакцій, у т. ч. кінцевого продукту iNOS-реакції – цитруліну [24]. Значний приріст рівня цитруліну в крові при ХСН унаслідок активації iNOS може свідчити про одночасне посилене утворення в клітинах також іншого кінцевого продукту iNOS – оксиду азоту, підвищена концентрація якого в цих умовах може спричинити

цитотоксичну та імуногенну дію, викликати різку вазодилатацію з підвищенням проникності судинної стінки, формуванням набрякового синдрому та прогресуванням патологічного процесу в клітинах серця та судин при ХСН [23].

#### ВИСНОВКИ

Системна імунозапальна активація та формування оксидативного стресу тісно взаємопов'язані: імунне запалення може як ініціювати формування оксидативного стресу, так і сприяти інтенсифікації вже існуючого на фоні основного захворювання оксидативного стресу, прогресуванню ХСН із розвитком тяжких ускладнень, що загрожують життю.

У взаємозв'язку між системною імунною активацією та інтенсивністю оксидативного стресу важливою зв'язувальною ланкою можна вважати активацію iNOS у клітинах крові та серцево-судинної системи. У зв'язку з цим активність iNOS та підвищення рівня цитруліну в циркулюючій крові можуть вважатися маркерами наявності імунної активації та оксидативного стресу, які зумовлюють прогресування основного серцево-судинного захворювання та ХСН.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мойбенко О. О. Фундаментальні механізми дії оксиду азоту на серцево-судинну систему як основи патогенетичного лікування її захворювань / О. О. Мойбенко, В. Ф. Сагач, М. М. Ткаченко // *Фізіологічний журнал*. – 2004. – 50. – С.11–30.
2. Gladwin M. T. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation / M. T. Gladwin, N. J. Raat, S. Shiva // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2006. – Vol. 291 (5). – P. 2026–2035.
3. Chatterjee A. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation / A. Chatterjee, S. M. Black, J. D. Catravas // *Vascul. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 49 (4–6). – P. 134–140.
4. Citrulline: from metabolism to therapeutic use / S. Bahri, N. Zerrouk, C. Aussel [et al.] // *Nutrition*. – 2013. – Vol. 29 (3). – P. 479–484.
5. Moinard C. Citrulline: a new player in the control of nitrogen homeostasis / C. Moinard C., Synober L. // *J. Nutr.* – 2007. – Vol. 137 (6) Suppl. 2. – P.1621–1625.
6. Stuehr D. J. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway / D. J. Stuehr // *J. Nutr.* – 2004. – Vol. 134 (10 Suppl.). – P. 2748S–2751S; discussion 2765S–2767S.
7. McSorley S. I. Nitric oxide pathway. *Encyclopedia of Immunology*. – P. I. Devis, I. M. Roitt ed. – N.Y. : Academic press. – 2004. – P.1859 Ed. 1861.
8. Platelet activation, oxidative stress and overexpression of inducible nitric oxide synthase in moderate heart failure / L. R. de Meirelles, C. Resende Ade, C. Matsuura [et al.] // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2011. – Vol. 38 (10). – P. 705–710.
9. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages / M. Rath, I. Müller, P. Kropp [et al.] // *Front Immunol.* – 2014. – Vol. 27 (5). – P. 532.
10. Стальная И. Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот / И. Д. Стальная // *Современные методы в биохимии*; под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 63–65.
11. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // *Современные методы в биохимии*; под ред. В. Н. Ореховича. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
12. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // *Вопросы медицинской химии*. – 1995. – № 41(1). – С. 24–26.
13. Спосіб діагностики прогресуючого атеросклерозу : пат. 30972 Україна : G01N33/48 / Євстратова Ірина Никифорівна, Мхітарян Лаура Сократівна, Орлова Ніна Миколаївна, Казімірко Емма Іванівна, Федун Наталія Миколаївна, Дроботько Тетяна Федорівна. – № 30972А ; заявл. 25.06.1998 ; опубл. 15.12.2000, Бюл. № 7.
14. Метод определения активности каталазы / М. А. Корольюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова [и др.] // *Лабораторное дело*. – 1988. – № 1. – С.16–18.
15. Misra H. P. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase / H. P. Misra, I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1972. – Vol. 247 (10). – P. 3170–3175.

16. Manolescu B. N. Effect of the nutritional supplement ALAnerv® on the serum PON1 activity in post-acute stroke patients / B. N. Manolescu, M. Berteanu, D. Cintează // *Pharmacological Reports: PR.* – 2013. – Vol. 65 (3). – P. 743–750.

17. Доценко О. И. Функционирование системы глутатиона эритроцитов в условиях окислительного стресса / О. И. Доценко // *Вестник Донецкого национального университета.* – 2009. – № 2. – С. 254–259.

18. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь. – 2000. – Т. 2. – С. 74–75.

19. Повышенная активность миелопероксидазы – фактор риска ишемической болезни сердца у больных сахарным диабетом / И. В. Горулько, В. А. Костевич, А. В. Соколов [и др.] // *Биомедицинская химия.* – 2012. – Т. 58, Вып. 4. – С. 475–484.

20. Спосіб визначення функціонального стану індуцельної NO-синтазної системи у хворих з серцево-судинною патологією : пат. u201011861 Україна : МПК

(2011.01) G01N 33/00 / Мхитарян Лаура Сократівна, Євстратова Ірина Никифорівна, Якушко Людмила Василівна, Ліпкан Наїра Георгіївна, Гавриленко Тетяна Іллівна. – № 57878 ; заявл. 06.10.2010 ; опубл. 10.03.2011, Бюл. № 5.

21. Snell F. D. Colorimetric methods of analysis / F. D. Snell, S. T. Snell. – New York : Van Nostrand, 1964. – P. 153–155.

22. Сердечно-сосудистые заболевания, связанные с параоксоназой и атеросклерозом / Д. А. Чистяков, А. А. Мельниченко, А. Н. Орехов, Ю. В. Бобрышев // *Биохимия.* – 2017. – №132. P. 19–27.

23. Giannitsi S. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation / S. Giannitsi, B. Maria, A. Bechlioulis, K. Naka // *JRSM Cardiovasc Dis.* – 2019. – Vol. 8. – P. 204800401984304.

24. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies / A. Aimo, V. Castiglione, C. Borrelli [et al.] // *Eur. J. Prev. Cardiol.* – 2020. – Vol. 27 (5). – P. 494–510.

#### REFERENCES

1. Moibenko OO, Sahach VF, Tkachenko MM, Korkushko OV, Bezrukov VV, Kulchytskyi OK, Stefanov OV, Soloviov AI, Mala LT, Frolkis VV. [Fundamental mechanisms of action of nitric oxide on the cardiovascular system as a basis for pathogenetic treatment of its diseases]. *Fiziolohichniy zhurnal.* 2004;50(1): 11-30. Available from: <https://fz.kiev.ua/index.php?abs=344>

2. Gladwin MT, Raat NJH, Shiva S, Dezfalian C, Hogg N, Kim-Shapiro DB, et al. Nitrite as a vascular endocrine nitric oxide reservoir that contributes to hypoxic signaling, cytoprotection, and vasodilation. *Am J Physiol Circ Physiol.* 2006;291(5): H2026-35. Available at: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00407.2006>

3. Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol.* 2008;49(4-6): 134-40. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189108000815>

4. Bahri S, Zerrouk N, Aussel C, Moinard C, Crenn P, Curis E, et al. Citrulline: From metabolism to therapeutic use. *Nutrition.* 2013;29(3): 479-84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900712002584>

5. Moinard C, Cynober L. Citrulline: A new player in the control of nitrogen homeostasis. *J Nutr.* 2007;137(6): 1621S-5S. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/137/6/1621S/4664929>

6. Stuehr DJ. Enzymes of the L-Arginine to nitric oxide pathway. *J Nutr.* 2004;134(10): 2748S-51S. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/134/10/2748S/4688471>

7. McSorley SI. Nitric oxide pathway. B: *Encyclopedia of immunology.* Pi. Devis. N.Y.Academic press; 2004.

8. Meirelles de LR, Resende A de C, Matsuura C, Salgado Â, Pereira NR, Cascarelli PG, et al. Platelet activation, oxidative stress and overexpression of inducible nitric oxide synthase in moderate heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2011;38(10): 705-10. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1681.2011.05580.x>

9. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol.* 2014;5. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00532/abstract>

10. Stalnaya ID. Method for determination of diene conjugation of unsaturated higher fatty acids. [Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот] Moscow: Meditsina; 1977. Russian.

11. Stalnaya ID, Garishvili TG. Method for the determination of malondialdehyde using thiobarbituric acid. [Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты] Orekhovich VN. ed. Moscow: Meditsina. Russian.

12. Dubinina EE, Burmistrov SO, Khodov DA, Porotov IG. [Oxidative modification of human serum proteins. A method of determining it]. *Vopr med khim.* 1995;41(1): 24-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7771084>

13. A method for diagnosing progressive atherosclerosis: Pat. 30972 Ukraine: G01N33/48 / Evstratova IN, Mkhitarayan LS, Orlova NM, Kazimirko EI, Fedun NM, Drobotko TF. No. 30972A; stated 25.06.1998; publ. 15.12.2000, Bull No. 7.

14. Korolyuk MA, Ivanova LI, Majorova IG, Tokarev VE [Method for determining catalase activity]. *Laboratornoe delo.* 1988;(1): 16-9. Russian.

15. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972;247(10): 3170-5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819452289>

16. Manolescu BN, Berteanu M, Cintează D. Effect of the nutritional supplement ALAnerv® on the serum PON1 activity in post-acute stroke patients. *Pharmacol Reports.* 2013;65(3): 743-50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1734114013710545>

17. Docenko OI. [Functioning of the erythrocyte glutathione system under conditions of oxidative stress]. *Vestnik Donetsk nati univer.* 2009;2: 254-9. Russian.
18. Kamyshnikov VS. Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics in 2 vol. [Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – в 2 т.] Minsk: Belarus; 2000. Russian.
19. Gorudko IV, Kostevich, VA, Sokolov AV, Buko IV, Konstantinova EE, Саpaeva NL, Mironova EV et al. [Increased activity of myeloperoxidase - a risk factor for coronary heart disease in patients with diabetes mellitus]. *Biomeditsinskaya himiya.* 2012;58(4): 485-4. Available from: <http://pbmc.ibmc.msk.ru/pdf/PBMC-2012-58-4-475>. Russian.
20. A method of determining the functional state of the inducible NO-synthase system in patients with cardiovascular pathology: UA Pat. u201011861 Ukraine: IPC (2011.01) G01N 33/00. Mkhitaryan LS, Evstratova IN, Yakushko LV, Lipkan NG, Gavrylenko TI. No. 57878; stated 06.10.2010; publ. 10.03.2011, Bul. No. 5. Ukrainian.
21. Snell FD, Snell ST. *Colorimetric method of analysis.* New York: Van Nostard; 2013.
22. Chistyakov DA, Melnichenko AA, Orekhov AN. [Cardiovascular diseases associated with paraoxonase and atherosclerosis]. *Biohimiya.* 2017;132: 19-27. Russian.
23. Giannitsi S, Maria B, Bechlioulis A, Naka K. Endothelial dysfunction and heart failure: A review of the existing bibliography with emphasis on flow mediated dilation. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2019;8: 204800401984304. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2048004019843047>
24. Aimo A, Castiglione V, Borrelli C, Saccaro LF, Franzini M, Masi S, et al. Oxidative stress and inflammation in the evolution of heart failure: From pathophysiology to therapeutic strategies. *Eur J Prev Cardiol.* 2020;27(5): 494-510. Available from: <https://academic.oup.com/eurjpc/article/27/5/494-510/5924888>

Отримано 04.10.21