

О.П. Хаврона, Н.В. Фартушок, Ю.М. Федевич, Я. Сольські, О.Я. Склярів

Зміни окисно-відновних процесів і жирнокислотного складу ліпідів печінки щурів за умов стрептозотоцинового діабету

Досліджували активність процесів ПОЛ, окиснювальну модифікацію білків, стан ензимів системи антиоксидантного захисту та жирнокислотний склад ліпідів печінки щурів за умов стрептозотоцинового діабету. Розвиток діабету супроводжувався окиснювальним стресом, в результаті якого активувалися процеси ПОЛ, зростав вміст оксиду азоту та змінювалася активність ензимів системи антиоксидантного захисту. Виявлено підвищення вмісту насичених і зниження вмісту ненасичених жирних кислот. Встановлено посилення процесів окиснення внутрішньоклітинних білків печінки, що може призвести до втрати їх біологічної активності. Ключові слова: перекисне окиснення ліпідів, окиснювальна модифікація білків, антиоксидантна система захисту, система глутатіону, жирні кислоти, оксид азоту, цукровий діабет.

ВСТУП

Численні експериментальні та клінічні дані свідчать про головне значення печінки в розвитку метаболічних ускладнень при діабеті 1-го типу, а зміна її функціонального стану безпосередньо впливає на перебіг та компенсацію цукрового діабету (ЦД). Частота ураження печінки при ЦД становить 33,0–90,0 % [4].

Печінка також відіграє ключову роль в обміні ліпідів в організмі людини, забезпечуючи їх інтенсивний біосинтез і перетворення основних груп, у тому числі і жирних кислот (ЖК). Роль мембранних ліпідів гепатоцитів у фізіологічних процесах і за умов розвитку патологічного стану, одночасно з багатьма іншими чинниками, залежить від їхнього кількісного та якісного складу. Відомо, що при багатьох патологічних процесах у клітинах печінки змінюється вміст ненасичених ЖК. При цьому істотно значення для забезпечення функціонально активного стану клітин має співвідношення насичених і ненасичених ЖК у мембранах [13]. Оскільки ненасичені

ЖК є структурними компонентами мембран і одночасно виступають основними субстратами ліпідної пероксидації, то якісні й кількісні їх зміни в мембранах гепатоцитів можуть бути певним критерієм для оцінки інтенсивності прооксидантно-антиоксидантної рівноваги в тканинах організму [17].

Оксид азоту за фізіологічних умов бере участь у вазодилатації, міжклітинній комунікації та передачі сигнальної інформації. За умов гіперглікемії активується експресія індукцибельної NO-синтази (iNOS) та різко зростає вміст NO, який при взаємодії з супероксидом кисню утворює пероксинітрит, що впливає на модифікацію білків, нуклеїнові кислоти, активність ензимів [6].

При ЦД активуються процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до цілої низки відхилень, зокрема, до структурної перебудови мембран гепатоцитів, і порушення клітинного метаболізму [20]. Відомо, що одним з механізмів такої активації при ЦД є порушення енерге-

© О.П. Хаврона, Н.В. Фартушок, Ю.М. Федевич, Я. Сольські, О.Я. Склярів

тичного обміну внаслідок чого підвищується вміст ненасичених ЖК, які є субстратами ПОЛ [15]. Через свою високу реактивність активні форми кисню взаємодіють з ліпідами мембрани клітин або органел, реагуючи з поліненасиченими ЖК, не тільки пошкоджуючи їхню структурну цілісність, але й генеруючи жирнокислотні радикали, що і призводить до порушень морфофункціонального стану мембран – починаючи від підвищеної проникності та закінчуючи лізисом клітин.

Вільнорадикальний гомеостаз клітин і тканин забезпечується рівновагою між процесами генерації активних кисневих метаболітів і ферментативними й неферментативними системами їх знешкодження. Розвиток патологічних станів, зазвичай, пов'язаний з порушеннями між про- та антиоксидантною системами, що призводить до розвитку окиснювального стресу, який супроводжується дисбалансом між цими системами й характеризується надмірною генерацією вільних радикалів (O_2^- , OH^- , $ONOO^-$, NOH^-) і/або дефіцитом антиоксидантів [17]. Окиснювальний стрес за умов ЦД 1-го типу викликає аутоокиснення глюкози, глікозилювання білків з утворенням кінцевих продуктів глікозилювання AGEs (від англ. advanced glycated end products) та активацію поліолового циклу [4].

Метою наших досліджень було вивчення окиснювальної модифікації білків, зміни жирнокислотного складу ліпідів, вмісту оксиду азоту та L-аргініну в тканині печінки у взаємозв'язку інтенсивності процесів ПОЛ і ферментативної ланки антиоксидантного захисту (АОЗ) за умов стрептозотинного діабету в щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на статевозрілих білих щурах-самцях масою 150–200 г, згідно з прийнятими етичними принципами роботи з лабораторними тваринами, ухвале-

ними Першим національним конгресом України з біоетики, міжнародними угодами та національним законодавством у цій галузі [10]. Експериментальний ЦД 1-го типу викликали введенням розчину стрептозотинину з розрахунку 60 мг/кг, внутрішньоочередово. Дослідження проводили на 14-ту добу розвитку патологічного стану, декапітацію виконували на тлі уретанового знеболення (1,1 мг/кг). Розвиток діабету контролювали за вмістом у крові глюкози, який визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів «Lachema» (Чехія). Критерієм розвитку захворювання був рівень глікемії 18–22 ммоль/л порівняно з контрольною групою – 7,2–8,4 ммоль/л. Контрольну групу склали 10 інтактних щурів, дослідну групу – 20 щурів. Об'єктами дослідження були гомогенати печінки, приготовані на фізіологічному розчині, при 4°C. Вміст стабільного метаболіту оксиду азоту (NO_2^-) в гомогенатах визначали з реактивом Грісса [19]. Процеси ПОЛ оцінювали за визначенням тіобарбітурової кислоти (ТБК)-реагуючих сполук [14], а також дієнових кон'югатів і дієнових кетонів [7]. Рівень SH-груп у гомогенатах печінки визначали за методом Thannhauser [23], а окисної модифікації білків (ОМБ) – за концентрацією карбонільних і основних груп [5]. Активність супероксиддисмутази (СОД) вивчали за допомогою реакції відновлення нітротетразолію синього до нітроформазау [16], каталази – з використанням реакції H_2O_2 з молібдатом амонію [9]. Концентрацію відновленого глутатіону визначали за методом Батлер [8], активність глутатіонпероксидази – Переслегіної [11], а вміст ЖК ліпідів – за допомогою газорідинної хроматографії [13], вміст L-аргініну – за кольоровою реакцією Сакагучі за наявності гіпоброміту натрію [1]. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі. Одержані результати статистично опрацьовані за критерієм t Стьюдента за допомогою програмного забезпечення ANOVA Microsoft Exel 8.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За умов експериментального ЦД 1-го типу у клітинах печінки відзначається зростання активності процесів ПОЛ (табл. 1).

При цьому у гепатоцитах відзначено активацію як початкових ланок процесів ліпопероксидації – вміст дієнових кон'югатів зростав у 2,3 рази ($P<0,05$) та дієнових кетонів – у 2 рази ($P<0,05$), так і кінцевого етапу – вміст ТБК-реагуючих продуктів підвищувався у 3,2 рази ($P<0,05$). Таке різке їх підвищення є показником завершення процесу вільнорадикального ушкодження поліненасичених ЖК і вилучення їх з біліпідного шару клітинної мембрани [15]. Паралельно підвищувався вміст нітрит-аніона на 54 % ($P<0,05$), за даними літератури, це може бути зумовлено збільшенням активності iNOS, що підтверджується зростанням внутрішньоклітинного рівня мРНК даного ензиму за умов гіперглікемії [2].

NO є оксидантом та інгібітором ферментів, що містять залізо-сірчані центри. При реакції NO з H_2O_2 утворюється пероксинітрит та інші білкові оксиданти. Взаємодіючи NO і пероксинітрит окиснюють біомолекули (протеїнів, амінокислот, ліпідів, ДНК), що проявляється підвищенням активності процесів окиснювальної модифікації білків (ОМБ), яка за значенням карбонільних груп (кОМБ) зросла у 5,9 рази ($P<0,05$), а основних груп (оОМБ) – у 16,9 рази ($P<0,01$). ОМБ призводить до зменшення або втрати їх біологічної

активності, викликає утворення антигенів і провокує імунну відповідь. Продукти розпаду модифікованих білків можуть бути причиною вторинного ушкодження інших біомолекул [18].

Результати досліджень показали, що за умов гіперглікемії знижувався вміст SH-груп на 25 % ($P<0,05$) порівняно з контрольною групою тварин, що може свідчити про зменшення редокс-потенціалу всередині клітини (див. табл. 1). Зменшення вмісту SH-груп може призводити до порушень структурно-функціональної організації білкових молекул і зниження їх реакційної здатності [20].

Серед досліджуваних вільних ЖК у тканині печінки шурів (табл. 2) при діабеті 1-го типу найбільш виражені зміни вмісту були виявлені у таких насичених ЖК: міристинова, стеаринова, пальмітинова (остання становила 21,7% від усіх ЖК), ненасичених – мононенасичених (пальмітоолеїнова та олеїнова) та поліненасичених (лінолева та арахідонова).

У тканині печінки контрольних шурів спостерігали найбільший вміст арахідонової кислоти, пальмітинової, стеаринової ЖК. Загальний вміст ненасичених ЖК у тканині був значно вищим, ніж насичених кислот і переважно представлений поліненасиченими ЖК, що підтверджується даними інших досліджень [13].

Вивчення спектра ЖК при експериментальному діабеті виявило значні зміни вмісту як ненасичених, так і насичених ЖК

Таблиця 1. Активність ліпопероксидації та окиснювальної модифікації білків у гомогенаті тканини печінки при стрептозотозинному діабеті у шурів ($M\pm m$)

Показники	Контроль (n=10)	Дослід (n=20)
ТБК-реагуючі сполуки, мкмоль/г білка	19,5±3,8	63,2±7,3*
Окисна модифікація білків карбонільних груп, λ_{370} /мг білка	7,2±1,9	42,5±5,4*
Окисна модифікація білків основних груп, λ_{430} /мг білка	1,20±0,76	20,31±3,20*
SH-групи, мкмоль/г білка	22,81±2,33	17,02±1,80*
Дієнові кетони, λ_{230} /мг білка	0,017±0,008	0,038±0,034*
Дієнові кон'югати, λ_{275} /мг білка	0,072±0,006	0,168±0,088*
NO_2^- , мкмоль/мг білка	0,485±0,029	0,751±0,046*

* $P<0,05$ – зміни вірогідні відносно значення у контролі.

у печінці тварин. Зокрема, найбільш різноспрямовані зміни спостерігалися на рівні поліненасичених ЖК. При цьому вміст лінолевої кислоти зріс у 1,3 раза ($P<0,05$), водночас вміст арахідонової ЖК знизився майже втричі ($P<0,01$). Такі метаболічні зміни можуть бути наслідком використання арахідонової кислоти як субстрату при активації ПОЛ, зростанні експресії циклооксигенази-2 та утворенні простагландинів або гальмуванні активності поліферментних систем у гепатоцитах, які беруть участь у перетворенні лінолевої кислоти в арахідонову [3]. Не менш значні зміни спостерігалися в спектрі насичених ЖК. Так, вміст пальмітинової кислоти збільшився в 1,8 раза ($P<0,05$), незначно підвищився вміст стеаринової ЖК, тоді як вміст міристинової кислоти знизився приблизно у 5 разів ($P<0,05$).

Таким чином, за умов ЦД зменшується сума ненасичених ЖК в 1,2 раза ($P<0,05$). Виявлені нами порушення жирнокислотного складу ліпідів печінки пояснює зростання вмісту ТБК-реагуючих продуктів, оскільки відомо, що саме ненасичені ЖК є субстратами для реакцій ПОЛ, внаслідок яких вони перетворюються на ліпопероксидази. Сумарний вміст насичених ЖК підвищувався внаслідок зростання вмісту стеаринової та пальмітинової ЖК. Такі зміни в жирнокислотному обміні в печінці щурів за умов гіперглікемії мають адаптивний характер і спрямовані на біосинтез більш стабільних насичених ЖК [15].

За умов оксидативного стресу, що проявляється надмірною генерацією вільних радикалів, в основному – активних форм кисню, спостерігається компенсаторна активація системи АОЗ, що пов'язано з відповідними змінами її компонентів. Ферментативний захист здійснюється за допомогою СОД, каталази та ензимів глутатіонової системи – глутатіонпероксидази, глутатіонредуктази та глутатіонтрансферази. Ці ензими послідовно відновлюють супероксид-радикали, H_2O_2 і органічні гідропероксидази.

З активних форм кисню первинною є супероксид-аніон, знешкодження якого відбувається за допомогою СОД, активність якої знижувалася у 1,6 раза ($P<0,05$; табл. 3). Це може відбуватися за рахунок можливості неферментативної модифікації молекули СОД як активним киснем, так і глюкозою [22].

Наступними антиоксидантними ферментами, що вступають у каскад реакцій захисту від активних форм кисню, є каталаза і глутатіонпероксидаза. У наших дослідженнях зростають активності цих ферментів – каталази в 2,4 раза ($P<0,05$), глутатіонпероксидази у 2,5 раза ($P<0,05$), що можна розцінювати як компенсаторну реакцію на збільшення активних кисневих метаболітів за інактивації СОД [22]. При стрептозотоциновому діабеті вміст відновленого глутатіону знижувався у 1,5 раза ($P<0,05$; табл. 3), ймовірно, в результаті протекторного його впливу на тіолові групи

Таблиця 2. Відсотковий вміст вільних жирних кислот у печінці щурів за умов стрептозотоцинового діабету ($M\pm m$)

Жирні кислоти	Контроль (n=10)	Дослід (n=20)
C _{14:0} міристинова	3,1±0,3	0,6±0,1*
C _{16:0} пальмітинова	21,7±1,0	34,5±1,2*
C _{16:1} пальмітоолеїнова	0,8±0,1	4,0±0,3*
C _{18:0} стеаринова	14,8±1,0	14,0±1,1*
C _{18:1} олеїнова	6,1±0,7	18,2±0,4**
C _{18:2} лінолева	10,9±0,8	13,9±0,2*
C _{20:4} арахідонова	42,6±1,5	14,8±0,5**
Сума насичених ЖК	39,6±2,0	49,1±1,6*
Сума ненасичених ЖК	60,4±2,0	50,9±1,4*

$P<0,05$, ** $P<0,01$ – зміни вірогідні відносно значення у контролі.

Таблиця 3. Зміна показників антиоксидантного захисту у печінці щурів при стрептозотоциновому діабеті (M±m)

Показники	Контроль (n=10)	Дослід (n=20)
Супероксиддисмутаза, мкмоль/хв . мг білка	146,03±18,20	88,82±12,80*
Каталаза, мкмоль/хв . мг білка	0,67±0,13	1,65±0,03*
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв . мг білка	2,32±0,62	5,96±0,87*
Відновлений глутатіон, мкмоль/мг білка	2,24±0,09	1,49±0,07*
L-аргінін, мкг/мл	43,29±0,04	28,86±0,06*

*P<0,05 – зміни вірогідні відносно значення у контролі.

білків, зберігаючи їхню активність при дії вільних радикалів, а також використання його для знешкодження перекису водню і гідропероксидів. Також можливе порушення синтезу глутатіону, оскільки відомо, що за умов діабету знижується γ -глутамілцистеїнсинтазна активність [22].

Особлива роль за умов діабету належить L-аргініну. З одного боку, він є прекурсором для синтезу NO, а з іншого – його пул у цитоплазмі гепатоцитів відіграє антиоксидантну роль [12]. При експериментальному ЦД вміст L-аргініну знижувався у 1,5 рази (P<0,05). Це пов'язано насамперед із його використанням NOS. Антиоксидантний ефект у цитозолі молекула L-аргініну здатна проявляти за рахунок рухливого атома водню, зумовленого нестійким зв'язком з атомами карбону та нітрогену. Крім того, антиоксидантні властивості здатні проявлятися і внаслідок окиснення аміногрупи молекули L-аргініну. L-аргінін зв'язує супероксидний та гідроксильний радикали, регулює редокс-статус у клітині, відіграє роль у захисті від оксидативних ушкоджень. При вживанні L-аргініну в крові знижується вміст глюкози, гомоцистеїну, ЖК, тригліцеридів і підвищується чутливість до інсуліну у щурів з експериментальним діабетом [24]. При ЦД змінюється синтез і транспорт аргініну. Слід відзначити, що L-аргінін є субстратом не тільки для NOS, але і для аргінази. За умов норми співвідношення між NOS та аргіназою забезпечує в клітинах відповідний пул L-аргініну, який при ЦД зменшується, внаслідок зростання активності

NOS та зниження активності аргінази [2]. Зниження активності аргінази може сприяти утворенню пероксинітриду та інших активних кисневих метаболітів, а також ініціації процесів ПОЛ [12].

Отже, в результаті проведених досліджень встановлено взаємозв'язок окисно-відновних процесів і жирнокислотного складу ліпідів у клітинах гепатоцитів та показано, що розвиток оксидативного стресу за умов стрептозотоцинового діабету супроводжується зменшенням вмісту арахідонової кислоти, посиленням процесів ліпопероксидації, вмісту оксиду азоту та зменшенням вмісту L-аргініну, посиленням процесів, що призводять до окисної модифікації білків та різкого збільшення активності більшості ферментів антиоксидантної системи, що треба врахувати при корекції перебігу ЦД.

ВИСНОВКИ

1. За умов ЦД, викликаного введенням стрептозотоцину, розвивається оксидативний стрес, про що свідчить збільшення вмісту ТБК-реагуючих продуктів, дієнових кон'югатів, дієнових кетонів та оксиду азоту у тканині печінки.

2. Виявлені порушення жирнокислотного складу ліпідів печінки в бік підвищення вмісту насичених та зниження ненасичених ЖК вказують на адаптивний характер змін і біосинтез більш стабільних ЖК за умов ЦД.

3. Збільшення вмісту ТБК-реагуючих продуктів супроводжується зменшенням вмісту арахідонової кислоти, що є свідчен-

ням посилення процесів ПОЛ у тканині печінки.

4. За умов гіперглікемії у тканині печінки підвищується активність ензимів АОЗ, а саме каталази, глутатіонпероксидази та знижується активність СОД, а також зростає вміст відновленого глутатіону та зменшується вміст L-аргініну.

5. При ЦД 1-го типу посилюються окиснення білків, що може призвести до порушення їх функціонування в гепатоцитах, утворення нових антигенів і провокації імунної відповіді.

О.П.Хаврона, Н.В.Фартушок, Ю.М.Федевич, Я.Сольски, А.Я.Скляр

ИЗМЕНЕНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНАВИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ

Исследовали активность процессов ПОЛ, окислительную модификацию белков, состояние энзимов системы антиоксидантной защиты и жирнокислотный состав липидов печени крыс при стрептозотоциновом диабете. Развитие диабета сопровождается окислительным стрессом, в результате которого активируются процессы ПОЛ, растет содержание нитрогена оксида и повышается активность некоторых энзимов системы антиоксидантной защиты. Обнаружено повышение содержания насыщенных и снижение содержания ненасыщенных ЖК. Установлено усиление процессов окисления белков, что может привести к потере их биологической активности.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, окислительная модификация белков, антиоксидантная система защиты, глутатионовая система, жирные кислоты, оксид азота, сахарный диабет.

O.Khavrona, N.Fartushok, J.Fedevich, Y.Solski, A. Sklyarov

THE CHANGES OF OXIDATIVE-REDUCTIVE PROCESSES AND FATTY ACID COMPOSITION OF LIVER LIPIDS IN RATS WITH STREPTOSOTOCIN-INDUCED DIABETES

The processes of lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, the state of antioxidant protection system enzymes and fatty acid composition of liver lipids were investigated in rats with streptozotocin-induced diabetes. The development

of diabetes is accompanied by oxidative stress, which results in the activation of lipid peroxidation processes and the increase in the amount of nitrogen oxide and the activity of antioxidant protection system enzymes. The increase of the amount of saturated fatty acid and fall in the amount of unsaturated fatty acid has been detected. The rise of the processes of protein oxidation was established, which can lead to loss of their biological activity.

Key words: lipid peroxidation, oxidative modification of proteins, antioxidant protection system, glutathione system, fatty acids, nitric oxide, diabetes.

Danylo Halytsky Lviv National Medical University;

Lublin Medical University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Алейникова Т.Л., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биохимии. – 1988. – 239 с.
2. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2008. – 54, №1. – С. 63–68.
3. Гарник Т.П., Білоусова І.В. Жирнокислотний склад ліпідів печінки щурів при експериментальній інсулінорезистентності // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – 34, №2. – С. 35–38.
4. Давидович Н.Я. Клініко-морфологічні зміни печінки у хворих на цукровий діабет 1 типу та їх корекція неоселеном та етимізолем: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Івано-Франківськ, 2001. – 20 с.
5. Дубинина Е.Е., Коновалов П.В., Солитернова И.Б. Окислительная модификация белков плазмы крови у пожилых людей с сосудистой деменцией // Укр. биохим. журн. – 2001. – 73, №1. – С. 125–132.
6. Зозуля Ю.А., Сенько Л.Н. Мультифункциональность и метаболизм оксида азота в центральной нервной системе (обзор литературы) // Журн. АМН України. – 2000. – 6, №1. – С.3–25.
7. Камышников В.С. Определение диеновых конъюгатов и диенкетонов // Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. – 2000. – 2. – С. 206.
8. Клиническая биохимия / Под ред. А.М. Горячковского. – Одесса: Астропринт, 1998. – С. 307.
9. Королюк Г.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988, № 1. – С. 16–19.
10. Перший національний конгрес з біоетики // Ежендельник АПТЕКА. – 2001. – № 37 (308) (від 24.09.2001).
11. Песлегина И.А. Метод определения активности глутатионпероксидазы // Лаб.дело. – 1989. – № 5. – С. 20–23.
12. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюруба А.В. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального

- цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №2. – С. 3–7.
13. Сазоненко Л.В., Вітовський Я.М., Брюзгіна Т.С., Вретік Г.М. Дослідження змін жирнокислотного спектру ліпідів сироватки крові у вагітних з прееклампсією // Мед.хімія. – 2003. – №3. – С.113–115.
14. Тимирбулатов Г. А., Селезнев Е. И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981, № 4. – С. 209–211.
15. Титов В.Н., Дучин С.Ф., Дмитриева В.А., Копылов М.А. Эссенциальные полиеновые жирные кислоты и артериальное давление. Механизмы физиологического влияния // Клини. лаб. диагностика. – 2006. – №11. – С. 3–12.
16. Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте // Лаб. дело. – 1991, № 10. – С. 15–19.
17. Bonnefont-Rousselot D., Bastar. J. P., Jaudon M. C. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance // Diabet. Metab. – 2003. – 26, № 3. – P. 163–176.
18. Flynn NE, Meininger CJ, Haynes TE, Wu G. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy // Biomed. Pharmacother. – 2002. – **56**. – P. 427–438.
19. Green LC., David AW. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**. – P. 131–138.
20. Mazzanti L, Rabini RA. Altered platelet membrane dynamic properties in type 1 diabetes // Diabetes. – 2005. – **46**, №12. – P. 2069–2074.
21. Mohamed AK., Bierhaus A., Schiekofer S., Tritschler H. The role of oxidative stress and NF-kappa B activation in late diabetic complications // Biofactors. – 2001. – **10**, №.2-3. – P. 157–167.
22. Pacher P., Beckman JS., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. – 2007. – **87**. – P. 315–424.
23. Thannhauser TW., Konishi Y., Scheraga HA. Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins // Analyt. Biochem. – 1984. – 138, №1. – P. 181–188.
24. Wu G., Bazer FW., Davis TA., Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease // Amino Acids. – 2009. – **37**. – P. 153–168.

*Львів. нац. мед. ун-т ім. Данила Галицького;
Люблін. мед. ун-т,
E-mail: sklyarov@meduniv.lviv.ua*

*Матеріал надійшов до
редакції 26.02.2010*