

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**ЯРЕМЧУК ОЛЬГА ЗЕНОВІЇВНА**

УДК 547.172.6/.495.9:616-005.6]-092.9

**МЕХАНІЗМИ ДІЇ МОДУЛЯТОРІВ СИСТЕМИ НІТРОГЕН ОКСИДУ  
ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АНТИФОСФОЛІПІДНОГО  
СИНДРОМУ**

03.00.04 «Біохімія»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису  
Роботу виконано в Тернопільському національному медичному університеті імені І. Я. Горбачевського Міністерства охорони здоров'я України

**Науковий консультант** доктор медичних наук, професор  
**Посохова Катерина Андріївна**,  
Тернопільський національний медичний  
університет імені І. Я. Горбачевського  
Міністерства охорони здоров'я України,  
директор Навчально-наукового інституту  
фармакології, гігієни та медичної  
біохімії імені М. П. Скакуна,  
професор кафедри фармакології  
з клінічною фармакологією

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, професор  
**Савчук Олексій Миколайович**,  
Київський національний  
університет імені Тараса Шевченка,  
завідувач кафедри біохімії

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Данилович Юрій Володимирович**,  
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,  
провідний науковий співробітник  
відділу біохімії м'язів

доктор біологічних наук,  
старший науковий співробітник  
**Іскра Руслана Ярославівна**,  
Інститут біології тварин НААН,  
завідувач лабораторії біохімії адаптації  
та онтогенезу тварин

Захист дисертації відбудеться «17» березня 2021 року о 12<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.08 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «16» лютого 2021 року

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

В. І. Цвіліховський

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Вивчення системи гемостазу є однією із актуальних проблем сьогодення та необхідною передумовою для кращого розуміння перебігу фізіологічних процесів, розроблення методів корекції патологічних станів та їх ускладнень. Порушення системи зсідання крові викликає взаємодія антифосфоліпідних антитіл з фосфоліпідами мембран, а також зв'язаними з цими фосфоліпідами глікопротеїнами (Насонов Е. Л., 2004; Волков Г. Л. и др., 2005; Marchi R. et al., 2015; Willis R., Gonzalez E. B., 2015). Однією з аутоімунних причин звичного невиношування вагітності є антифосфоліпідний синдром (Chighizola C. B., Jesus G. R., 2014, Щурук Н. В., 2018, який виявляють у 27–42 % випадків серед пацієнток із невиношуванням вагітності, при цьому в 90 % жінок без адекватного лікування ембріон гине (Таран О. І., 2014; Гончарова А. А. и др., 2018; Амриева Д. Х. и др., 2019). Антифосфоліпідні антитіла активують прокоагуляційний стан, спричиняють високий ризик виникнення тромбозів, плацентарної недостатності, внутрішньоутробної затримки росту плода, прееклампсії, завмирання плоду на пізніх термінах вагітності (Giannakopoulos B., Krilis S. A., 2013; Белолипецкая Е. А. и др., 2017; Есауленко И. Э. и др., 2017; Корнюшина Е. А. и др., 2018; Collicot M. et al., 2019). Нещодавно було підтверджено утворення антифосфоліпідних антитіл під час гострої фази COVID-19, проте не завжди це супроводжувалося розвитком тромбозу (Devreese K. M. J. et al., 2020; Zuo Y. et al., 2020; Mendoza-Pinto C. et al., 2020). При антифосфоліпідному синдромі спостерігається порушення функцій внутрішніх органів, ураження центральної нервової системи, легень, нирок, ендокринних залоз, печінки тощо (Mayer M. et al., 2010; Запорожан В. Н. и др., 2015; Ульянова О. В., и др., 2016; Яковенко О. К. и др., 2019; Lourenco C. F. et al., 2017; Corban M. T. et al., 2017; Fleetwood T. et al., 2018). Високий ризик інвалідизації, порушення репродуктивної функції у жінок надає цій проблемі соціального значення. Незважаючи на високу актуальність, молекулярні механізми, які лежать в основі розвитку антифосфоліпідного синдрому та ураження головного мозку, печінки і нирок при цій патології, сьогодні залишаються недостатньо з'ясованими, що ускладнює його діагностику, профілактику та лікування.

Відомо декілька основних механізмів впливу антифосфоліпідних антитіл на систему гемостазу: активація тромбоцитів, взаємодія з ендотеліальними клітинами і моноцитами, зв'язування із тромбіном та активація системи комплементу, що призводить до утворення тромбів (Krone K. A. et al., 2010; Острякова Е. В. и др., 2011; Макацария А. Д. и др., 2012; Giannakopoulos B., Krilis S., 2013; Arachchillage D. R. J., Laffan M., 2017). Важливе значення в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому має ендотеліальна дисфункція, що проявляється порушенням антитромботичної і протизапальної активності ендотелію (Wijetilleka S. et al., 2012; Velasquez M. et al., 2018). Однією з ланок, що відіграють роль у механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому, є система нітроген оксиду (Ames P. R. et al., 2010). Проте є лише поодинокі дослідження, суперечливого змісту, про порушення синтезу

і біодоступності нітроген оксиду в ендотелії за умов антифосфоліпідного синдрому (Rytlewski K. et al., 2008; Cella M. et al., 2010; Ames P. R. et al., 2010; Lopez-Pedreria Ch. et al., 2016). Відомо, що гіперпродукування нітроген оксиду збільшує маткові скорочення і ризик невиношування вагітності. Проте значне зниження його рівня призводить до передчасних пологів (Cella M. et al., 2010). Механізм, за допомогою якого антифосфоліпідні антитіла спричиняють втрату вагітності при антифосфоліпідному синдромі, вивчено недостатньо (Rahman A., 2016). Одним із важливих компонентів патогенезу антифосфоліпідного синдрому, що сприяють дисфункції імункомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл, є оксидативний стрес (Perez-Sanchez C. et al., 2012). При взаємодії антифосфоліпідних антитіл із фосфоліпідами мембран розвивається дисбаланс компонентів цитокінових і кінінових каскадів, реалізуються процеси апоптозу та некрозу (Tang K. T. et al., 2019). У літературі відсутні результати досліджень функціонування системи нітроген оксиду, вільнорадикальних та запальних процесів у головному мозку, печінці й нирках за умов антифосфоліпідного синдрому, що і викликало зацікавленість у зв'язку з поширеністю цієї патології в загальній популяції близько п'яти нових випадків на 100 тис. осіб на рік (Cervera R., 2017; Яковенко О. К. та ін., 2019).

Отже, встановлення молекулярних механізмів, зокрема ролі системи нітроген оксиду у розвитку антифосфоліпідного синдрому, та пошук ефективних методів корекції ускладнень, які виникають при цьому, є актуальною проблемою. Недостатність та суперечливість літературних даних щодо ролі системи нітроген оксиду у розвитку антифосфоліпідного синдрому та його ускладнень спонукала до проведення досліджень з метою з'ясування ступеня залученості цієї системи до механізмів розвитку антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей, а також до вивчення механізмів ураження мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок при антифосфоліпідному синдромі. Оскільки синтез нітроген оксиду є регульованим процесом (Wong V., Lerner E., 2015; Genc H. et al., 2017), крім безпосереднього вивчення компонентів його системи при антифосфоліпідному синдромі, було зосереджено увагу на дослідженні властивостей модуляторів синтезу нітроген оксиду – попередника нітроген оксиду L-аргініну та інгібітора індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідину. Є лише поодинокі дослідження про роль модуляторів синтезу нітроген оксиду в механізмах розвитку цього синдрому та його ускладнень. Відповідно, важливим і перспективним напрямом наукових досліджень є з'ясування механізмів реалізації дії модуляторів синтезу нітроген оксиду за умов антифосфоліпідного синдрому та пошук ефективних засобів для корекції ускладнень, що виникають.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація є фрагментом комплексних науково-дослідних тем кафедри медичної біохімії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних та біогенних токсикантів в біологічних системах» (номер державної реєстрації 0112U000542, 2012–2015 рр.); «Біохімічні механізми порушень метаболізму за умов

надходження до організму токсикантів різного генезу» (номер державної реєстрації 0116U003353, 2016–2019 рр.), співвиконавцем яких була здобувач.

**Мета та завдання дослідження.** Мета роботи – встановити роль системи нітроген оксиду в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому у вагітних і невагітних мишей та з'ясувати механізми реалізації дії попередника нітроген оксиду L-аргініну та інгібітора індукцибельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідину за умов антифосфоліпідного синдрому.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано такі завдання:

- дослідити роль порушень системи нітроген оксиду та ендотеліальної дисфункції у механізмах розвитку експериментального антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c;

- дослідити вплив L-аргініну та аміногуанідину на стан системи гемостазу у вагітних та невагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому;

- оцінити характер і ступінь порушень цитокінової ланки імунітету у вагітних та невагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому й при введенні L-аргініну та аміногуанідину;

- з'ясувати вплив L-аргініну та аміногуанідину на інтенсивність апоптозу в лейкоцитах крові та печінці вагітних та невагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому;

- дослідити вміст гліального фібрилярного кислого протеїну й основного протеїну мієліну у мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому, а також під впливом L-аргініну та аміногуанідину;

- дослідити рівень аутоантитіл до протеїнів головного мозку вагітних та невагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому та при введенні L-аргініну та аміногуанідину;

- дослідити вплив L-аргініну та аміногуанідину на патобіохімічні ланки ураження мозку, печінки та нирок, прояви оксидативного і нітрооксидативного стресу вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому;

- з'ясувати характер гістологічних та електронно-мікроскопічних змін у печінці й нирках мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому і при введенні L-аргініну та аміногуанідину.

*Об'єкт дослідження* – роль системи нітроген оксиду в механізмах розвитку експериментального антифосфоліпідного синдрому та його ускладнень.

*Предмет дослідження* – молекулярні та біохімічні процеси в мозочку, півкулях великого мозку, печінці й нирках вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому, а також вплив модуляторів синтезу нітроген оксиду (L-аргініну та аміногуанідину) на їх перебіг.

**Методи дослідження:** біохімічні та оптичні (спектрофотометрія, фотоелектроколориметрія, протокова цитометрія, світлова й електронна мікроскопія), фізико-хімічні (диск-електрофорез), імунохімічні (Вестерн-блот аналіз, ELISA), статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Отримано нові дані й поглиблено існуючі уявлення про роль системи нітроген оксиду і механізми дії модуляторів синтезу нітроген оксиду (L-аргініну та аміногуанідину) за умов антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c.

Вперше встановлено механізми впливу L-аргініну та аміногуанідину на розвиток ендотеліальної дисфункції у вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому. Відзначено нормалізацію кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові тварин із антифосфоліпідним синдромом, яким вводили окремо L-аргінін і при комбінованому застосуванні з аміногуанідином. Відмічено покращення ультраструктури синусоїдних гемокапілярів печінки, зменшення пошкодження ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину за умов антифосфоліпідного синдрому.

Вперше досліджено роль системи нітроген оксиду в механізмах ураження головного мозку, печінки і нирок вагітних та невагітних мишей при антифосфоліпідному синдромі. Встановлено, що в мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом виникає відносна недостатність нітроген оксиду, який синтезується під впливом ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду, на фоні загального підвищення рівня нітроген оксиду.

Вперше доведено, що комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину переважає за своїм позитивним впливом на стан системи нітроген оксиду їх окреме введення вагітним та невагітним мишам за антифосфоліпідного синдрому. При цьому у сироватці крові та печінці тварин зростає вміст ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду з одночасним зниженням вмісту індукцибельної ізоформи даного ензиму, що супроводжується нормалізацією рівня стабільних метаболітів нітроген оксиду у мозочку, півкулях великого мозку, печінці й нирках.

Вперше досліджено механізми впливу L-аргініну та аміногуанідину на показники реалізації апоптозу і вміст активних форм оксигену в лейкоцитах крові вагітних та невагітних мишей за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. Показано, що застосування L-аргініну та аміногуанідину (окреме і комбіноване введення) у вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом призводить до нормалізації показників життєздатності лейкоцитів та вмісту активних форм оксигену в гранулоцитах і агранулоцитах. Вперше показано, що під впливом L-аргініну у печінці вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом знижується вміст каспази-3. При комбінованому введенні L-аргініну та аміногуанідину вагітним мишам із цією патологією встановлено нормалізацію вмісту каспази-3 в печінці.

Вперше досліджено зміни вмісту нейроспецифічних протеїнів гліального фібрилярного кислого протеїну й основного протеїну мієліну у мозочку і півкулях великого мозку за умов антифосфоліпідного синдрому. Установлено збільшення загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну і його ізоформи (37 kDa) в мозочку та півкулях великого мозку невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Ці зміни супроводжуються

підвищенням вмісту основного протеїну мієліну у досліджуваних структурах центральної нервової системи та збільшенням вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa і >170 kDa). Вперше встановлено, що окреме введення інгібітора індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідину і застосування його в комбінації з L-аргініном супроводжуються зниженням загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну та його ізоформи (37 kDa) в мозочку і півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. Показано, що при окремому введенні аміногуанідину та застосуванні його в комбінації з L-аргініном у мозочку вагітних тварин із цією патологією знижується вміст олігомерних форм основного протеїну мієліну (95–110 kDa).

Вперше встановлено, що L-аргінін у невагітних та вагітних мишей за умов антифосфоліпідного синдрому зменшує прояви оксидативного стресу в печінці та нирках: знижує рівень гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів, відновлює активність супероксиддисмутази, каталази і вміст відновленого глутатіону з одночасним зростанням активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази.

Встановлено, що аміногуанідин окремо та при комбінованому застосуванні з L-аргініном за антифосфоліпідного синдрому у мишей зменшує прояви оксидативного стресу в мозочку і півкулях великого мозку, що супроводжується пригніченням процесів вільнорадикального окиснення та активацією системи антиоксидантного захисту.

Доведено, що при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину проявляються виражені нейропротекторні, антиоксидантні, гепато- та нефропротекторні властивості за умов антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей.

Новизну дослідження підтверджено патентом України на корисну модель (№ 142063 від 12.05.2020 р.).

**Практичне значення одержаних результатів.** Розширення існуючих уявлень про молекулярні механізми розвитку експериментального антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей, ушкодження головного мозку, печінки і нирок при цій патології, з'ясування ролі змін синтезу нітроген оксиду в механізмах розвитку даних уражень дозволять здійснювати цілеспрямований пошук ефективних засобів лікувально-профілактичної дії серед модуляторів синтезу нітроген оксиду для корекції функціональних та структурних змін мозку, печінки і нирок при антифосфоліпідному синдромі й при його поєднанні з вагітністю. Встановлення факту підвищення ефективності корекції ускладнень антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей при комбінованому застосуванні попередника нітроген оксиду L-аргініну та інгібітора індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідину, порівняно з їх окремим введенням, сприяє покращенню розуміння біохімічних механізмів патологічних проявів, які виникають, що дозволить робити цілеспрямований, обґрунтований вибір методів їх корекції.

Основні результати впроваджено у науково-педагогічний процес ряду кафедр закладів вищої освіти України: кафедри біохімії Харківського

національного університету імені В. Н. Каразіна; кафедри біоорганічної, біологічної та клінічної Вищого державного навчального закладу України «Буковинський державний медичний університет»; кафедри біологічної та загальної хімії Вінницького національного медичного університету імені М. І. Пирогова; кафедри біологічної та медичної біохімії імені академіка Т. О. Бабенка Державного вищого навчального закладу «Івано-Франківський національний медичний університет»; кафедри біологічної хімії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького; кафедри хімії Миколаївського національного університету імені В. О. Сухомлинського; кафедри медичної біохімії, кафедри патологічної фізіології; кафедри функціональної і лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

**Особистий внесок здобувача.** Автор самостійно виконано всі етапи роботи: проведено літературний пошук, написано огляд літературних джерел, обґрунтовано актуальність проблеми, виконано експериментальні дослідження, статистичну обробку отриманих даних, аналіз, систематизацію і узагальнення отриманих результатів, підготовлено результати роботи до друку. Спільно з науковим консультантом професором К. А. Посоховою сплановано окремі етапи роботи, обговорено одержані результати. У наукових працях, опублікованих у співавторстві, а також патенті України на корисну модель, актах впровадження основний внесок належить автору.

**Апробація результатів дисертації.** Результати роботи було представлено на: 9<sup>th</sup> Meeting of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies (м. Краків, Республіка Польща, 2013 р.); науково-практичній конференції «Довкілля і здоров'я» (м. Тернопіль, 2013 р.); Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 2013 р., 2016 р., 2017 р., 2018 р.); науково-практичній конференції «Актуальні питання безпечного застосування ліків» (м. Тернопіль, 2013 р.); XI Українському біохімічному конгресі (м. Київ, 2014 р.); підсумковій науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 2014 р.; 2020 р.); XII Українському біохімічному конгресі (м. Тернопіль, 2019 р.); науково-практичній конференції «Актуальні питання фармакології та фармакотерапії» (м. Тернопіль, 2019 р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020» (м. Запоріжжя, 2020 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 40 наукових праць, з яких 13 статей у наукових фахових виданнях України, 8 статей у наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus/Web of Science, 4 статті у наукових виданнях інших держав, патент України на корисну модель, 14 тез наукових доповідей.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація викладена на 392 сторінках та складається з анотацій, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, розділів результатів експериментальних досліджень, аналізу й узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних



джерел, що містить 422 посилання (277 джерел латиницею) та додатків. Робота ілюстрована 29 таблицями і 72 рисунками.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** Експериментальні дослідження проведено на 406 мишах-самках лінії BALB/c масою 25–30 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Експерименти виконано на базі Центральної науково-дослідної лабораторії (Свідоцтво про атестацію № 053/13 від 04.03.2013 р.), міжкафедральної навчально-дослідної лабораторії (Свідоцтво про атестацію № 052/13 від 04.03.2013 р.) Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України та частину досліджень – на базі відділу біохімії вітамінів і коензимів Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України. Гістологічні й електронно-мікроскопічні дослідження проведено за участю завідувача кафедри гістології та ембріології професора З. М. Небесної. Кількість десквамованих ендотеліоцитів визначали за участю завідувача кафедри патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною професора Я. Я. Боднара. Автор висловлює щире подяку співробітникам вказаних підрозділів за надану організаційну та методичну допомогу.

Усі маніпуляції з експериментальними тваринами виконували при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах.

Антифосфоліпідний синдром (АФС) моделювали за допомогою кардіоліпіну («Sigma», США), який вводили внутрішньом'язово чотири рази (30 мкг на одну ін'єкцію, проміжки між ін'єкціями становили 14 діб) (Зайченко Г. В. та ін., 2011). З метою підвищення ефективності імунної відповіді кардіоліпін емульгували в 75 мкл повного ад'юванту Фрейнда («Difco Laboratories», США) (перша ін'єкція), для наступних ін'єкцій використовували неповний ад'ювант Фрейнда («Difco Laboratories», США). Для підтвердження розвитку АФС проводили реакцію мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном (Зайченко Г. В. та ін., 2011). У групах мишей лінії BALB/c, в яких моделювали АФС, встановлено наявність антикардіоліпінових антитіл.

Дослідних тварин розділили на 10 груп: I, Ia (контроль) – тварини без АФС; II, IIa – тварини з експериментальним АФС; III, IIIa – тварини з АФС, яким вводили L-аргінін (L-Arg); IV, IVa – тварини з АФС, яким вводили аміногуанідин (AG); V, Va – тварини з АФС, яким вводили L-Arg у комбінації з AG. L-Arg («Sigma», США, 25 мг/кг) та AG («Хімлаборреактив», Україна, 10 мг/кг) вводили внутрішньочеревно один раз на день, впродовж 10 діб після формування АФС і 17 діб вагітності (Посохова К. А., Буковська В. В., 2002; Посохова К. А. та ін., 2014; Олещук О. М., 2014). Дози коригувальних чинників

для мишей розраховували, виходячи з коефіцієнта видової чутливості. Тварини контрольних груп отримували внутрішньочеревно ідентичні об'єми розчинника. Через 10 діб з моменту підтвердження АФС тварин I, II, III, IV та V груп виводили з експерименту за умов тіопентал-натрієвого наркозу (внутрішньочеревне введення 1 % розчину з розрахунку 50 мг/кг маси миші). Через 10 діб після початку застосування коригувальних чинників самок Ia, IIa, IIIa, IVa і Va груп спарювали із самцями та виводили з експерименту на 18 день вагітності за умов тіопентал-натрієвого наркозу. З метою підтвердження вагітності вивчали вагінальні мазки (Зайченко Г. В. та ін., 2011). Для дослідження використовували сироватку крові, плазму крові, популяцію лейкоцитів крові, тканини мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок.

Показники системи зсідання крові (активованій частковий тромбопластинний час (АЧТЧ), протромбіновий час, протромбіновий індекс, міжнародне нормалізоване відношення) та концентрацію фібриногену досліджували на двоканалному напівавтоматичному коагулометрі «Humaclot Duo Human». Кількість тромбоцитів визначали на автоматичному гематологічному аналізаторі ABX Micros 60. Визначення активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, вмісту сечовини та креатиніну проводили, використовуючи стандартні набори реактивів «Lachema» на біохімічному аналізаторі Humalyzer 2000. Реакцію мікропреципітації з кардіоліпіновим антигеном проводили за допомогою тест-системи «Антиген кардіоліпіновий, для реакції мікропреципітації» («Біолік», Україна).

Про вміст нітроген оксиду (NO) в сироватці крові й гомогенатах органів робили висновок за кількістю його стабільних метаболітів – нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) та нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ), визначали за даними кольорової реакції з реактивом Гріса, нітрати до нітритів відновлювали металічним цинком в оцтовокислому розчині (Green I. C. et al., 1982; Киселик І. О. та ін., 2001). Вміст індукцибельної NO-синтази (iNOS, КФ 1.14.13.39) та ендотеліальної NO-синтази (eNOS, КФ 1.14.13.39) у сироватці крові й печінці визначали методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів, адаптовані для мишей: «Mouse NOS2/iNOS (Nitric Oxide Synthase 2, Inducible) ELISA Kit», «Mouse NOS3/eNOS (Nitric Oxide Synthase 3, Endothelial) ELISA Kit» (Express Biotech International, США). Кількість вільноциркулюючих ендотеліальних клітин у крові визначали за способом (Hladovec J., 1978) в модифікації (Сівак В. В. та ін., 2007).

Вміст цитокінів у сироватці крові оцінювали методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартні набори реактивів, адаптовані для мишей: «Mouse IL-1 $\beta$  ELISA Assay», «Mouse IL-6 ELISA Assay», «Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Assay», «Mouse IL-4 ELISA Assay», «Mouse IL-10 ELISA Assay» (Express Biotech International, США).

Лейкоцити отримували з периферичної крові дослідних тварин після гемолізу еритроцитів. Вміст активних форм кисню в лейкоцитах крові оцінювали, використовуючи 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетат у кінцевій концентрації 25 мкмоль/л (Гузик М. М. та ін., 2013). Інтенсивність

флуоресценції 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату (DCF) прямо пропорційна вмісту активних форм кисню у клітинах. Інтенсивність випромінювання досліджуваних зразків реєстрували за каналом FL1 (515–535 нм) протокового цитофлуориметра Coulter Epics XL («Beckman Coulter», США), який оснащено аргонним лазером ( $\lambda_{\text{будж.}}=488$  нм). Перерозподіл між різними типами лейкоцитів оцінювали з використанням двох параметрів протокового цитофлуориметра: за величиною прямого (FS, розмір клітин) та бічного світлорозсіювання (SS, гранулярність клітин). Апоптоз у популяції лейкоцитів крові досліджували, використовуючи анексин V, кон'югований із GFP (green fluorescent protein), та пропідій йодид (PI), згідно з методикою (Rieger A. M. et al., 2011). Обробку результатів проводили за допомогою програми FCS Express V3.

Розділення і детекцію протеїнів (гліального фібрилярного кислого протеїну (GFAP), основного протеїну мієліну (MBP), каспази-3 проводили за допомогою диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію (SDS-PAGE) відповідно до методики (Laemmli U. K., 1970) та Вестерн-блот аналізу за методикою (Burnette W. N., 1981). Денситометричний аналіз виконували за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 («Nonlinear Inc, США). Концентрації протеїнів визначали за методами (Lowry O. M. et al., 1951; Bradford M. M., 1976).

Рівень вільнорадикального окиснення ліпідів визначали за вмістом гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) (Гаврилов В. Б., Мишкорудная М. И., 1983) (метод ґрунтується на здатності екстрагованих гептан-ізопропіловою сумішшю ГПЛ інтенсивно поглинати світло при  $\lambda=233$  нм) і ТБК-активних продуктів (Андреева Л. И. и др., 1989) (визначали в реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК)). Активність супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) визначали за зменшенням швидкості відновлення нітротетразолію синього за присутності NADH і феназинметасульфату (Чевари С. и др., 1985), активність каталази (КАТ, КФ 1.11.1.6) – за здатністю перексиду гідрогену утворювати із солями молібдену стійкий забарвлений комплекс (Королюк М. А. и др., 1988), вміст відновленого глутатіону (G-SH) – за здатністю його вільних SH-груп взаємодіяти з 5,5'-дитіо-біс-2-нітробензойною кислотою з утворенням тіонітрофенільного аніона, кількість якого прямо пропорційна вмісту G-SH (Ellman G. L., 1959). Мітохондрії виділяли методом диференційного центрифугування гомогенату мозочка, півкуль великого мозку, печінки та нирок (Камышников В. С., 2004). Активність сукцинатдегідрогенази (СДГ, КФ 1.3.99.1) визначали за відновленням фериціаніду калію до фероціаніду калію сукцинатом під дією СДГ (Ещенко Н. Д., Вольский Г. Г., 1982). Активність цитохромоксидази (ЦХО, КФ 1.9.3.1) визначали за методом (Кривченкова Р. С., 1977), який ґрунтується на здатності ензиму окиснювати диметил-пара-фенілендіамін і  $\alpha$ -нафтол з утворенням індофенолового синього.

Для гістологічних та електронно-мікроскопічних досліджень (Горальський Л. П. та ін., 2011) використовували тканини печінки та нирки мишей. Гістологічні препарати досліджували під світловим мікроскопом MIKROmed SEO SCAN та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera із системою виводу зображення гістологічних препаратів.

Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікромомі LKB-3 (Швеція), контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю за методом Рейнольдса та вивчали, використовуючи електронний мікроскоп ПЕМ-125К.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програм Statistica 10 (StatSoft, США), Origin 7.5 (Origin Lab Corp., США). Критерій Шапіро – Уїлка використовували для перевірки нормальності вибірок. Отриманий цифровий матеріал було оброблено загальноприйнятими методами варіаційного аналізу з використанням критерію Колмогорова – Смірнова і тесту Левайна для визначення нормальності й гомогенності дисперсії та критерію Манна – Уїтні. За умови нормального розподілу та гомоскедастичності вибірок проводили однофакторний дисперсійний аналіз. В інших випадках використовували аналіз Краскела – Уолліса з апостеріорними попарними тестами Манна – Уїтні з поправкою Бонфероні. Дані вказано як середні арифметичні величини ( $M$ ) та похибки середніх арифметичних ( $m$ ). Зміни вважали достовірними при  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Дослідження стану системи нітроген оксиду і розвитку ендотеліальної дисфункції при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії L-аргініну й аміногуанідину.* Однією з ланок, що беруть участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС, є система NO (Svenungsson E. et al., 2001; Ames P. R. et al., 2010; Ramesh S. et al., 2011). Роль NO в патогенезі цієї патології зумовлена як прямою, так і опосередкованою дією (Napoli C., Ignarro L. J., 2009; Moore C. et al., 2010; Lopez-Pedrerera Ch. et al., 2016). Зважаючи на те, що важливу роль у підтриманні судинного тонуусу та попередженні тромбоутворення відіграє активність ендотеліальної ізоформи NO-синтази (Napoli C., Ignarro L. J., 2009; Moore C. et al., 2010; Lopez-Pedrerera Ch. et al., 2016), важливо було визначити її вміст у мишей з АФС. Аналіз одержаних даних свідчить про те, що у тварин із цією патологією вміст eNOS у крові знижувався в 1,2 раза, в печінці – в 1,7 раза (рис. 1 А, 1 Б), при цьому вміст iNOS у крові зростав у 4,1 раза, в печінці – у 2,2 раза (рис. 1 В, 1 Г) порівняно з показниками тварин контрольної групи. Аналогічна тенденція зберігалася у вагітних мишей з АФС. Установлено, що на 18 день вагітності в них знижувався вміст eNOS у крові в 1,7 раза та печінці – в 1,8 раза порівняно з показниками тварин контрольної групи.

Інгібування антифосфоліпідних антитіл eNOS є одним із молекулярних механізмів розвитку недостатності NO при АФС (Ramesh S. et al., 2011; Mineo C., Shaul P. W., 2011; Mineo C., 2013). Зниження вмісту eNOS лежить в основі підвищеної адгезії тромбоцитів до судинного ендотелію та виникнення тромбозів (Ramesh S. et al., 2011). Водночас, у вагітних мишей з АФС зростав вміст iNOS у крові в 4,5 раза та печінці – в 3,5 раза, що, ймовірно, може бути спричинено збільшенням продукції прозапальних цитокінів – інтерлейкінів (IL-1 $\beta$ , IL-6) та фактора некрозу пухлин- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Svenungsson E. et al., 2001).

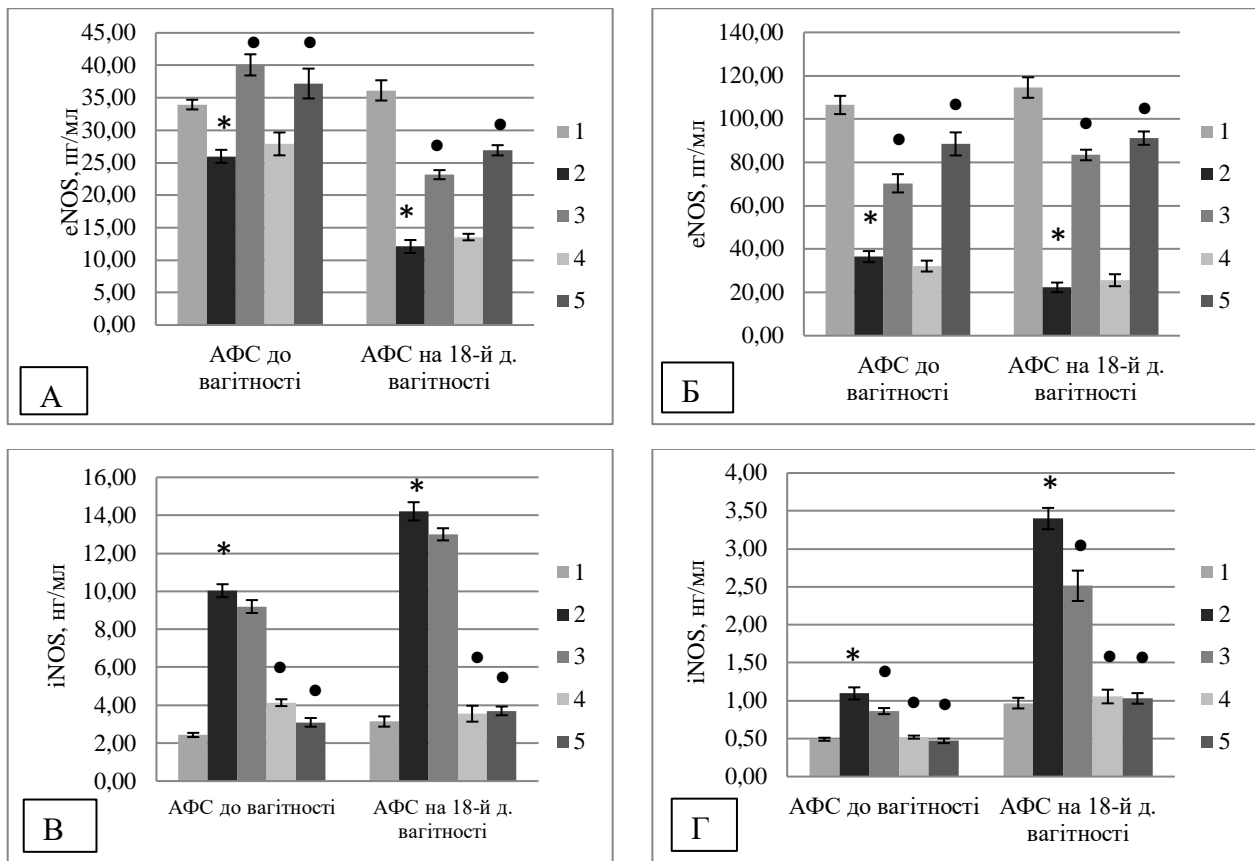


Рис. 1. Вміст ендотеліальної та індукційної ізоформ NO-синтази в сироватці крові (А, В) та печінці (Б, Г) вагітних та невагітних мишей лінії BALB/с з антифосфоліпідним синдромом та при введенні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Примітка. Умовні позначення груп тварин: 1 – контроль; 2 – антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-Arg; 4 – АФС + AG; 5 – АФС + L-Arg + AG; \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

Встановлено зниження концентрації  $\text{NO}_2^-$  і підвищення концентрації  $\text{NO}_3^-$  в сироватці крові та печінці вагітних та невагітних мишей за умов АФС, що вказує на дисрегуляцію синтезу NO та порушення функції ендотелію (Насонов Е. Л., 2004; Ames P. R. et al., 2010). Результати, які отримали, свідчать про те, що синтез і біодоступність NO порушуються при АФС (Javadi-Paydar M. et al., 2009; Cella M. et al., 2010; Ames P. R. et al., 2010). Відомо, що під час вагітності стан матково-плацентарного кровообігу прямо залежить від функціонування системи NO. Зниження рівня NO у крові вагітних призводить до виникнення дисбалансу мікроциркуляції у фетоплацентарному колі кровообігу, що супроводжується розвитком гіпоксії плода, затримкою його розвитку та порушенням стану новонародженого (Rytlewski K. et al., 2008). Встановлено, що у групах вагітних і невагітних мишей з АФС збільшувався вміст стабільних метаболітів NO в мозочку та нирках. У півкулях великого мозку тварин із цією патологією зростав рівень  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  відносно контролю. Проте у досліджуваних зразках півкуль великого мозку вагітних мишей лінії

BALB/c за умов АФС достовірно знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  порівняно з показниками вагітних тварин без цього синдрому.

Отже, результати проведених досліджень свідчать про те, що за умов експериментального АФС у мишей лінії BALB/c виникає відносна недостатність NO, який синтезується під впливом eNOS, на фоні загального гіперпродукування NO, який синтезується під впливом iNOS.

Порушення синтезу та біодоступності NO при АФС може бути пов'язано як із недостатністю субстрату для синтезу NO L-Arg, так і з підвищеним утворенням супероксидного аніон-радикалу, який швидко зв'язує та інактивує NO (Насонов Е. Л., 2004; Rytlewski K. et al., 2008; Cella M. et al., 2010; Lopez-Pedreria Ch. et al., 2016). При дослідженні результатів екзогенного постачання субстрату для реакції утворення NO встановлено, що за застосування L-Arg невагітним та вагітним мишам з АФС зростає вміст eNOS у крові (в 1,5 й 1,9 рази) та печінці (в 1,9 і 3,7 рази) порівняно з показниками тварин із цією патологією. Одним із механізмів дії L-Arg є відновлення активності ендотеліальної ізоформи NO-синтази через постачання субстрату (Pore A. J. et al., 2009). Водночас, вміст iNOS у крові достовірно не змінювався за введення L-Arg у невагітних та вагітних мишей з АФС. За застосування попередника NO L-Arg зменшувався вміст iNOS у печінці невагітних мишей з АФС в 1,2 рази та вагітних тварин із цією патологією в 1,3 рази порівняно з показниками мишей з АФС. У сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-Arg зростає вміст стабільних метаболітів NO відносно показників тварин із АФС. Оскільки метаболізм L-Arg здійснюється шляхом окисного перетворення з участю NOS до NO та L-цитруліну і неокисного з участю аргінази (КФ 3.5.3.1) до сечовини й орнітину, перетворення L-Arg під час окиснювальної трансформації на гідроксиргнін, який є інгібітором аргінази, може підвищувати кількість внутрішньоклітинного NO (Граник В. Г., 2003; Сибірна Н. О. та ін., 2010).

Аміногуанідин – нуклеофільна гідразинова сполука, конкурентний інгібітор iNOS (Svenungsson E. et al., 2001; Heush H. et al., 2010; Genc H. et al., 2017). За введення AG вміст iNOS знижувався у крові невагітних та вагітних мишей з АФС (у 2,4 і 4,0 рази) та печінці (у 2,1 і 3,2 рази) порівняно з відповідними показниками у тварин з АФС. Введення AG не викликало достовірних змін вмісту eNOS у крові та печінці мишей лінії BALB/c з АФС. При введенні AG вагітним та невагітним мишам із цією патологією у сироватці крові, мозочку, півкулях великого мозку та нирках мишей з АФС зменшувався вміст стабільних метаболітів NO. Вміст  $\text{NO}_2^-$  зростає у печінці мишей з АФС на 18 день вагітності. Водночас, введення AG супроводжувалося зниженням вмісту  $\text{NO}_3^-$  у печінці вагітних та невагітних тварин із АФС. Отримані результати можуть бути зумовлені порушенням нітритредуктазного балансу при блокуванні ферментативного синтезу NO (Сибірна Н. О. та ін., 2010).

При комбінованому застосуванні L-Arg та AG у невагітних та вагітних мишей з АФС зростає вміст eNOS у сироватці крові (в 1,4 і 2,2 рази) та печінці (у 2,4 і 4,1 рази) порівняно з показниками тварин із цією патологією. Водночас, зареєстровано зниження вмісту iNOS у сироватці крові (в 3,2 і 3,8 рази) та печінці

(у 2,3 і 3,3 раза), що зумовило нормалізацію вмісту стабільних метаболітів нітроген оксиду –  $\text{NO}_2^-$  і  $\text{NO}_3^-$  у сироватці крові та досліджуваних органах невагітних та вагітних мишей при АФС.

Ендотеліальна дисфункція, що поєднується з рецидивним тромбозом, є одним із основних проявів АФС, розвивається за умов пригнічення здатності ендотелію синтезувати вазодилатори, тоді як вміст судинозвужувальних факторів зберігається або зростає (Wijetilleka S. et al., 2012; Ohmura K. et al., 2014; Velasquez M. et al., 2018). Водночас, баланс між ендогенними чинниками, які забезпечують вазоконстрикцію та вазодилатацію, відіграє важливу роль у функціонуванні ендотелію. Основними проявами ендотеліальної дисфункції є порушення біодоступності NO за рахунок дефіциту його субстрату – L-Arg, порушення експресії eNOS, пришвидшений метаболізм NO (Степанов Ю. М. и др., 2004). Одним із показників розвитку ендотеліальної дисфункції в мишей з АФС є підвищення кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів. Установлено, що у невагітних тварин з АФС кількість десквамованих ендотеліоцитів зростає в 1,6 раза відносно інтактних. У вагітних мишей з АФС кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів збільшується у 2,4 раза порівняно з показниками вагітних тварин без АФС. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів, які підтверджують важливу роль ендотеліальної дисфункції в патобіохімічних механізмах розвитку АФС (Rytlewski K. et al., 2008; Cella M. et al., 2010; Wijetilleka S. et al., 2012; Velasquez M. et al., 2018). Індуковані антифосфоліпідними антитілами зміни ендотеліоцитів відіграють важливу роль в адгезії клітин до ендотелію (Alves J. D. et al., 2005; Belizna C. et al., 2008). Встановлено, що на за введення L-Arg невагітним та вагітним мишам з АФС знижувалась кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові (в 1,4 та 1,8 раза) порівняно з показниками тварин із цією патологією. Введення AG не викликало достовірних змін показників кількості десквамованих ендотеліоцитів у тварин з АФС. При комбінованому застосуванні L-Arg та AG спостерігали нормалізацію кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів. Таким чином, на фоні інгібування iNOS AG зберігається позитивний вплив L-Arg на стан ендотелію судин при АФС.

При проведенні ультраструктурних досліджень за умов експериментального АФС встановлено суттєві ураження судин мікроциркуляторного русла печінки. Визначаються синусоїдні гемокапіляри з розширеними, кровонаповненими просвітами і деструктуризованою стінкою. У просвітах виявляють еритроцити, нейтрофіли, тромбоцити, фібринові маси. Наявні також залишки клітин, вакуолі, за рахунок чого в полях спостереження частіше визначаються клітини Купфера, основною ознакою яких є наявність первинних і вторинних лізосом. Відмічають десквамацію деструктивно змінених ендотеліальних клітин у просвіт гемокапіляра. Ядра таких клітин пікнотично змінені, каріолема утворює інвагінації, наявне локальне розширення перинуклеарного простору. Для цитоплазми ендотеліоцитів характерні набряк, просвітлення, вакуолізація мембранних органел. Периферичні, цитоплазматичні ділянки містять незначну кількість мікропіноцитозних пухирців та кавеол.

Мембрани плазмолемі васкулярної поверхні гепатоцитів погано контуруються, у просторах Діссе визначається мало мікроворсинок, вони фрагментовані (рис. 2).

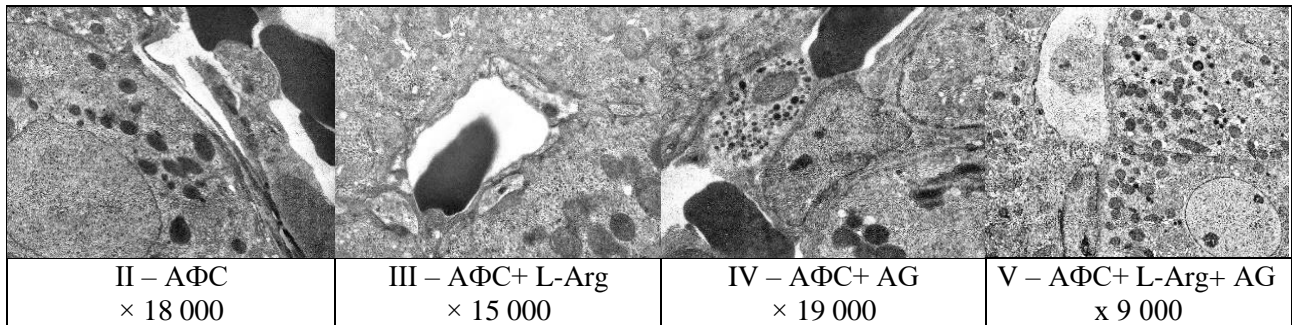


Рис. 2. Ультраструктурні зміни гемокапілярів печінки мишей лінії BALB/c при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні L-аргініну й аміногуанідину

Під впливом L-Arg при АФС відновлюється ультраструктура гемокапілярів часточок печінки. Субмікроскопічно структурні компоненти більшості синусоїдних кровоносних капілярів печінки в цій групі тварин більш збережені, ніж при АФС. У помірно розширених просвітах судин наявні здебільшого еритроцити, є небагато лейкоцитів і тромбоцитів. Ядра ендотеліальних клітин округлі, каріоплазма відносно електронноосвітла, в ній переважає еухроматин, мембрани каріолеми чітко виражені, рідко виявляють розширення перинуклеарного простору. В цитоплазмі навколо ядра визначаються органели, які не так значно змінені, як у групі тварин з АФС. Канальці ендоплазматичної сітки помірно розширені, в мітохондріях кристи незначно деструктуризовані, матрикс просвітлений. У периферичних, цитоплазматичних ділянках клітин зростає кількість мікропіноцитозних міхурців, наявні наскрізні перфорації. Добре визначаються мікроворсинки у просторі Діссе.

За застосування AG при АФС зміни гемокапілярів гепатоцитів мали менший ступінь ультраструктурної деструкції, ніж у тварин із цією патологією.

У групі тварин з АФС за комбінованого застосування L-Arg та AG спостерігали найбільший позитивний вплив коригуючих чинників на гемокапіляри, ультраструктура яких наближена до печінки тварин контрольної групи. Ультраструктура ендотеліальних клітин відновлена, видовжені електронноосвітлі ядра містять у каріоплазмі еухроматин. Каріолема чітка, мембрани не ушкоджені, суцільні, наявні численні ядерні пори. Парануклеарно наявні структурно не змінені органели загального призначення. Тільки деякі канальці ендоплазматичної сітки розширені, а в деяких мітохондріях ущільнений матрикс. Відновлена ультраструктура периферичних цитоплазматичних ділянок ендотеліоцитів, у них наявні численні мікропіноцитозні міхурці. Простори Діссе добре структуровані й містять мікроворсинки. Таким чином, за умов комбінованого застосування L-Arg та AG при АФС покращується ультраструктура синусоїдних гемокапілярів печінки, зменшується ушкодження мембранних органел, ядерних і плазматичних мембран ендотеліоцитів.



**Стан системи гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії L-аргініну й аміногуанідину.** У групі мишей з АФС встановлено тромбоцитопенію та подальше зниження кількості тромбоцитів у вагітних тварин із цією патологією. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів, які стверджують, що тромбоцитопенія трапляється у 28 % випадків первинного АФС і у 22 % випадків вторинного АФС (Krone K. A. et al., 2010).

Антифосфоліпідні антитіла, взаємодіючи з фосфоліпідами мембран тромбоцитів і ендотеліоцитів та факторами зсідання крові, сприяють тромбоутворенню, викликають посилення синтезу тромбоксану, підвищення концентрації цитозольного кальцію, що призводить до збільшення агрегації тромбоцитів (Cuadrado M. J. et al., 1997; Горницкая О. В., 2008; Vasilenko I. et al., 2009; Krone K. A. et al., 2010). У вагітних та невагітних тварин з АФС спостерігали зростання концентрації фібриногену (рис. 3), що свідчить про схильність до гіперкоагуляції (Демина Т. Н., Фирсова Н. А., 2016) та є одним з основних факторів ризику виникнення серцево-судинних захворювань, зокрема спричиняє розвиток тромботичних ускладнень та інфаркту міокарда (Кондратюк А. С., Гриненко Т. В., 2010).

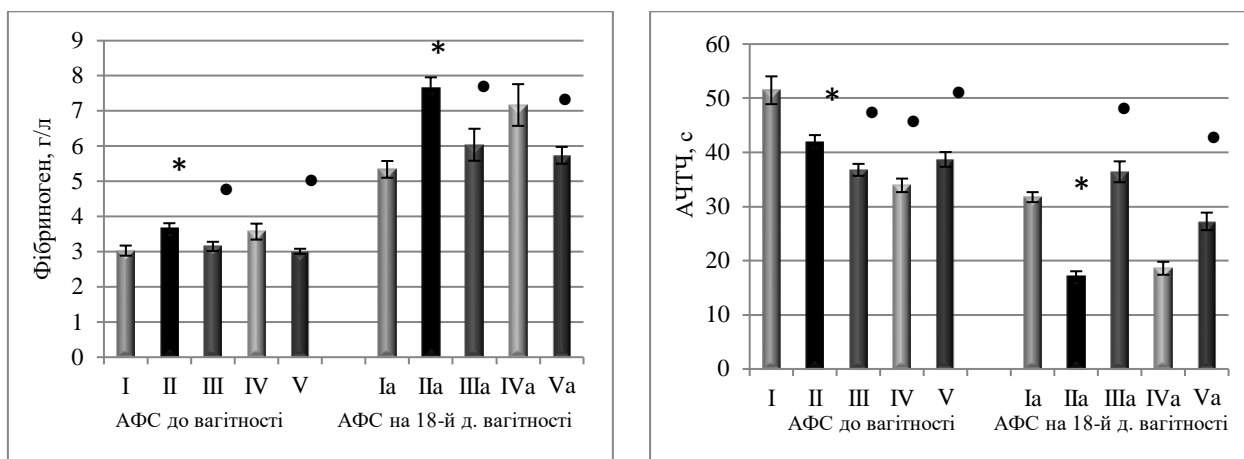


Рис. 3. Концентрація фібриногену й активований частковий тромбопластиновий час у крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом й при застосуванні L-аргініну та аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Примітка. Умовні позначення груп тварин: I, Ia – контроль; II, IIa – антифосфоліпідний синдром (АФС); III, IIIa – АФС + L-Arg; IV, IVa – АФС + AG; V, Va – АФС + L-Arg + AG; \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

Встановлено, що в невагітних мишей з АФС відбувається вкорочення АЧТЧ (на 19 %), а під час вагітності (на 46 %) (див. рис. 3), що вказує на підвищену здатність до тромбоутворення (Рогожина И. Е., 2011), а також зниження міжнародного нормалізованого відношення, що свідчить про гіперкоагуляцію і ризик тромбоутворення в невагітних та вагітних самок за умов

АФС. Відомо, що при фізіологічній вагітності адаптаційною реакцією системи гемостазу є збільшення продукування факторів зсідання крові та функціональної активності тромбоцитів (Макаров О. Г., 2016).

L-аргінін – це амінокислота, яка через утворення NO за фізіологічних умов регулює тонус судин, знижує адгезію лейкоцитів і тромбоцитів до судинної стінки, пригнічує активність тромбоцитів та перешкоджає тромбоутворенню, знижує проліферацію гладком'язових клітин судин, а отже, L-Arg може бути ефективним у корекції судинних ускладнень при АФС (Gornik H. L., Creager M. A., 2004). Встановлено, що при введенні L-Arg у мишей з АФС кількість тромбоцитів зростала на 51 % порівняно з показниками тварин з АФС. Ймовірно, це відбувається через те, що одним із ефектів NO є гальмування фосфоліпази C, що запобігає активації протеїнкінази C і сприяє пригніченню агрегації та адгезії тромбоцитів (Остапченко Л. І. та ін., 2010). За введення L-Arg у тварин з АФС до вагітності зареєстровано зниження концентрації фібриногену. Водночас, встановлено вкорочення АЧТЧ, що свідчить про підвищену здатність до тромбоутворення. Введення L-Arg вагітним мишам з АФС супроводжувалося зменшенням концентрації фібриногену, подовженням АЧТЧ у 2,1 раза, зростанням міжнародного нормалізованого відношення відносно вагітних тварин із цією патологією.

Введення AG вагітним та невагітним мишам з АФС призводило до подальшого прогресування патологічних змін коагулограми. Зниження міжнародного нормалізованого відношення у тварин з АФС за застосування AG свідчило про гіперкоагуляцію та ризик тромбоутворення.

При комбінованому застосуванні L-Arg та AG у невагітних та вагітних мишей з АФС зростала кількість тромбоцитів відповідно на 53 і 39 %, знижувалася концентрація фібриногену відповідно на 18 та 25 % порівняно з показниками тварин із цією патологією. У вагітних мишей з АФС, яким вводили L-Arg у комбінації з AG, відбувалося подовження АЧТЧ на 59 % і зростання міжнародного нормалізованого відношення порівняно з показниками тварин із АФС на 18 день вагітності.

Отже, L-Arg сприяє відновленню показників системи гемостазу та нормалізації кількості тромбоцитів за умов АФС. Позитивний вплив на параметри системи гемостазу у вагітних та невагітних мишей за умов АФС зростає при комбінованому застосуванні L-Arg з AG.

**Цитокіновий профіль при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії L-аргініну й аміногуанідину.** Одним із центральних прозапальних цитокінів при АФС є TNF- $\alpha$ , рівень якого відображає патологічні процеси в ендотеліальних клітинах. Антифосфоліпідні антитіла і TNF- $\alpha$  можуть активувати ендотелій, що призводить до збільшення генерації тромбіну в кровотоці. Активація ендотеліальних клітин викликає підвищення регуляції тканинного фактора, що лежить в основі механізму розвитку тромбозу при АФС (Swadzba J. et al., 2011). Отже, важливо було оцінити вміст TNF- $\alpha$  за умов АФС. Встановлено зростання концентрації TNF- $\alpha$  в 4,5 раза у сироватці крові тварин з АФС відносно контролю. Слід зазначити, що не з'ясовано до кінця, як антифосфоліпідні антитіла діють на ендотеліальні клітини – безпосередньо

або через посередництво TNF- $\alpha$ . Проте, незалежно від механізму, протромботичний стан, типовий для АФС, пов'язаний із значно підвищеним рівнем як антифосфоліпідних антитіл, так і TNF- $\alpha$  (Menachem A. et al., 2012). Встановлено, що вміст IL-1 $\beta$  та IL-6 в сироватці крові мишей з АФС зростає у 3,2 і 2,3 рази відносно контролю. Отримані результати про збільшення концентрації прозапальних цитокінів в сироватці крові тварин із АФС узгоджуються з даними інших авторів (Farzaneh-Far A. et al., 2006; Середавкіна Н. В. и др., 2010; Becarevic M., 2017).

Цитокіни відіграють важливу роль у збереженні вагітності, беруть участь в ембріогенезі, процесі закладки та розвитку ряду органів (Sulagna D., Pallav S., 2017). Встановлено, що у тварин з АФС на 18 день вагітності зростає концентрація цитокінів порівняно з показниками тварин контрольної групи: IL-1 $\beta$  – у 4,6 рази, IL-6 – у 3,5 рази, TNF- $\alpha$  – у 4,8 рази. Антитіла проти  $\beta$ 2-глікопротеїну I активують продукування прозапальних цитокінів під час вагітності, що може провокувати запалення і загибель клітин трофобласту (Chighizola C. B., Jesus G. R., 2014; Мадей П. та ін., 2015; Щурук Н. В., 2018). Фактор некрозу пухлини- $\alpha$  відіграє важливу роль у патогенезі індукованих антифосфоліпідними антитілами втрат плода (Berman J. et al., 2005; Александрова Е. Н. и др., 2009; Середавкіна Н. В. и др., 2010). Відомі різні механізми, через які TNF- $\alpha$  може провокувати втрату вагітності. Зокрема, він бере участь у процесах апоптозу, підсилює синтез простагландинів, що спричиняє скорочення матки. Підвищений рівень TNF- $\alpha$  негативно впливає на імплантацію ембріона, призводить до розвитку тромбозу в судинах трофобласту (Щурук Н. В., 2018).

Крім загальноприйнятого шляху активації прозапальних цитокінів, до механізмів розвитку АФС також залучені IL-4 та IL-10 (Бицадзе В. О. и др., 2015; Soltesz P. et al., 2008). Під час досліджень встановлено зниження концентрації IL-4 в 1,9 рази та IL-10 у 2,2 рази у сироватці крові тварин із АФС порівняно з показниками контролю. Отримані результати можна пояснити тим, що приєднання аФЛ до поверхні ендотеліальних клітин, крім активації факторів тромбоутворення, пригнічує синтез ендотелієм протизапальних цитокінів (Венцківська І. Б. та ін., 2011; Gomez-Puerta J. A., Cervera R., 2014). Під час вагітності відбувається ряд змін, спрямованих на її збереження та запобігання відторгненню плідного яйця, до яких належать посилення гуморального імунітету і продукування IL-4, IL-10 (Щурук Н. В., 2018; Aljameil N. et al., 2018). У мишей з АФС на 18 день вагітності знижувалася концентрація протизапальних цитокінів порівняно з показниками контрольної групи: IL-4 – у 2,1 рази, IL-10 – в 1,7 рази. Отримані результати узгоджуються з даними інших авторів (Венцківська І. Б. та ін., 2011).

Таким чином, встановлено, що у сироватці крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов АФС порушується цитокіновий баланс із зростанням концентрації прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) і зниженням концентрації протизапальних цитокінів (IL-4 та IL-10) порівняно з показниками контролю, що, ймовірно, може спричиняти порушення нормального розвитку трофобласту та зумовлює ризик переривання вагітності (Щурук Н. В., 2018).

Нині недостатньо відомостей про роль змін активності системи NO в балансі про- і протизапальних цитокінів при АФС. Відповідно, пошук серед модуляторів синтезу NO ефективних засобів корекції порушень, що виникають за умов АФС, є актуальним завданням. Важливість його підтверджується відсутністю єдиної точки зору щодо ролі системи NO у розвитку АФС. Встановлено, що при введенні мишам з АФС L-Arg зменшувався вміст IL-1 $\beta$  та IL-6, порівняно з показниками тварин із АФС. Ймовірно, в мишей з АФС, яким вводили L-Arg, концентрація TNF- $\alpha$  знижувалася через те, що L-Arg бере участь у синтезі глутаміну, який може зменшувати рівень розчинних рецепторів TNF- $\alpha$  (Степанов Ю. М. и др., 2004). Слід також зазначити, що IL-1 $\beta$  активує синтез IL-6 та iNOS, викликаючи підвищений синтез NO. Прозапальні цитокіни TNF- $\alpha$ , IL-2 та  $\gamma$ -інтерферон також збільшують рівень iNOS (Шейбак В. М., Павлюковец А. Ю., 2013). Продукування NO під впливом iNOS є одним із компонентів ефективної імунної відповіді (Венцківська І. Б. та ін., 2011; Salim T. et al., 2016). Введення AG супроводжується зниженням лише концентрації TNF- $\alpha$  у тварин з АФС до та під час вагітності й зростанням концентрації IL-4 у вагітних самок із цією патологією.

За комбінованого застосування L-Arg та AG встановлено достовірне зменшення концентрації IL-1 $\beta$  на 30 %, IL-6 на 16 %, TNF- $\alpha$  на 59 % відносно показників мишей з АФС. Водночас, зростала концентрація протизапальних цитокінів: IL-4 на 35 %, IL-10 на 25 %. На 18 день вагітності за використання L-Arg та AG спостерігали зниження концентрації IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  і підвищення концентрації IL-4 та IL-10 відносно показників вагітних тварин з АФС. Отже, на за інгібування індукцйбельної ізоформи NO-синтази AG зберігався позитивний вплив L-Arg на цитокіновий профіль, змінений при АФС. Більше того, при застосуванні такої комбінації чинників корекції зростав рівень протизапальних цитокінів порівняно з групою тварин, які отримували лише L-Arg.

***Вплив L-аргініну й аміногуанідину на процеси реалізації апоптозу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі.*** У результаті проведених досліджень встановлено, що при АФС знижується життєздатність лейкоцитів крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c порівняно з контролем. Їх загибель у тварин з АФС більшою мірою зумовлена активацією апоптозу, а у вагітних мишей із цією патологією – активацією процесів некрозу. За патологічних умов *in vivo* обидва типи клітинної загибелі часто можуть співіснувати. Якщо вміст аденозинтрифосфату на цих етапах значно нижчий за норму, то подальші процеси реалізації апоптозу – формування апоптосом, активація каскаду каспаз – не можливі, а стимульовані клітини гинуть за типом некрозу (Остапченко Л. І. та ін., 2010). Апоптотичні клітини можуть бути джерелом антигену та стимулювати утворення антифосфоліпідних антитіл. Більше того, білково-фосфоліпідні комплекси, що утворюються під час апоптозу, є мішенню для антифосфоліпідних антитіл. Зв'язування та кліренс апоптотичних клітин цими аутоантитілами, ймовірно, ще більше посилюють опосередковану антифосфоліпідними антитілами імунну відповідь (Andreoli L. et al., 2013; Manganelli V. et al., 2015).

Встановлено перерозподіл між двома основними типами лейкоцитів у невагітних та вагітних мишей за умов АФС із переважанням гранулоцитів (зростання на 48 та 55 %). Ймовірно, це пов'язано з активацією запальних процесів (de Groot P. G., Urbanus R. T., 2015).

Оскільки одним із важливих компонентів патогенезу АФС є утворення активних форм оксигену (Urbonaviciute V. et al., 2019), доцільно було оцінити рівень їх утворення в лейкоцитах мишей із цією патологією. Отримані результати свідчать про зниження продукування активних форм оксигену у гранулоцитах та агранулоцитах вагітних та невагітних мишей за умов АФС (рис. 4), що сприяє дисфункції імункомпетентних клітин і синтезу аутоантитіл (Kelkka T. et al., 2014; Kienhofer D. et al., 2016). Одержані результати узгоджуються з даними інших авторів (Kienhofer D. et al., 2016; Urbonaviciute V. et al., 2019).

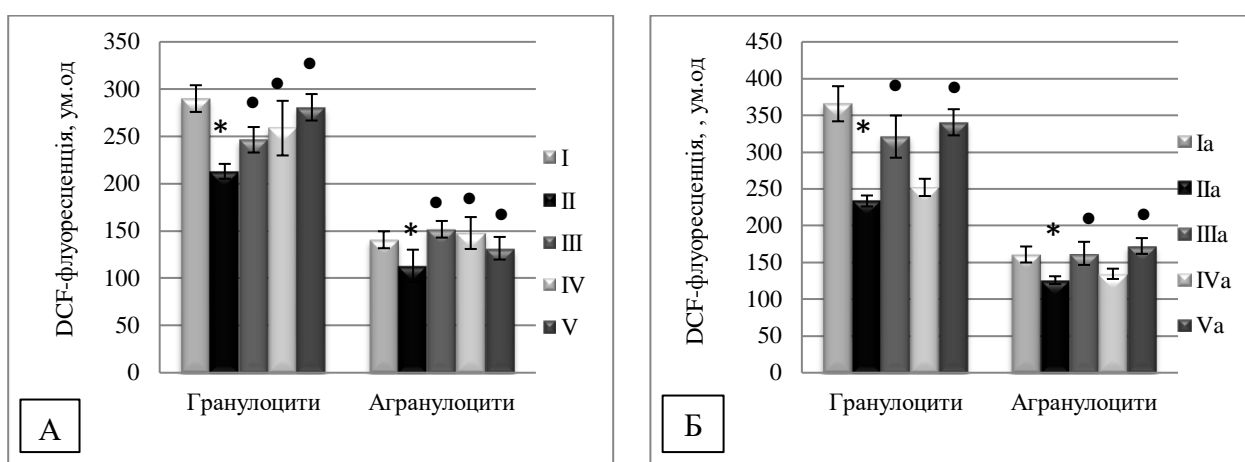


Рис. 4. Рівень активних форм оксигену в лейкоцитах крові невагітних (А) та вагітних (Б) мишей лінії BALB/с за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Примітка. Умовні позначення груп тварин: I, Ia – контроль; II, IIa – антифосфоліпідний синдром (АФС); III, IIIa – АФС + L-Arg; IV, IVa – АФС + AG; V, Va – АФС + L-Arg + AG; \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

NO індукує як апоптоз, так і некротичну загибель клітин залежно від редокс-форми, стану клітини та його рівня. Слід зазначити, що сигнальних шляхів NO-індукованого апоптозу досі не вивчено, проте відомо, що він може супроводжуватися акумуляцією гена-супресора пухлин p53, змінами експресії Bcl-2, активацією каспаза-3-подібних протеаз, транслокацією цитохрому c (Остапченко Л. І., та ін., 2010; Leon-Bollotte L. et al., 2011).

Встановлено, що за окремого застосування L-Arg та AG у лейкоцитах крові мишей з АФС знижувався вміст AV-GFP+- та PI+-клітин відносно показників тварин із цією патологією, що призводило до підвищення життєздатності лейкоцитів крові. Антиапоптотична дія NO також включає як рецептор смерті, так і мітохондріальні шляхи апоптозу (Saligrama P. T. et al.,

2014). В індукції активації лейкоцитів при АФС відіграють роль медіатори запалення (de Groot P. G., Urbanus R. T., 2015). За застосування L-Arg мишам з АФС у крові спостерігали подальше зростання кількості гранулоцитів, кількість агранулоцитів знижувалася на 25 % відносно тварин із цією патологією. Проте у вагітних мишей, яким вводили L-Arg, кількість гранулоцитів зменшувалася на 23 %, кількість агранулоцитів збільшувалася на 34 % відносно тварин з АФС на 18 день вагітності. Введення AG мишам з АФС не впливало на кількість гранулоцитів та агранулоцитів у крові. Під час оцінювання ступеня утворення активних форм кисню в лейкоцитах мишей з АФС, яким вводили окремо L-Arg чи AG, встановлено зростання вмісту активних форм кисню у гранулоцитах та агранулоцитах порівняно з показниками тварин із цією патологією (див. рис. 4). У вагітних мишей з АФС, яким вводили AG, не спостерігали достовірних змін вмісту активних форм кисню у гранулоцитах та агранулоцитах.

Встановлено, що за комбінованого введення L-Arg та AG мишам з АФС, на відміну від їх окремого застосування, більшою мірою пригнічувалися процеси реалізації апоптозу в лейкоцитах крові, що супроводжувалося зниженням вмісту AV-GFP+-клітин на 55 %, вмісту PI+-клітин – на 31 % порівняно з показниками тварин із цією патологією. У вагітних мишей за умов АФС при комбінованому введенні L-Arg та AG спостерігали нормалізацію показників життєздатності лейкоцитів. Комбіноване використання L-Arg і AG у вагітних та невагітних мишей з АФС зумовлювало відновлення рівноваги між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів до рівня контролю, нормалізацію вмісту активних форм кисню у гранулоцитах та агранулоцитах відносно показників тварин із цією патологією (див. рис. 4). Ймовірно, дисбаланс між рівнями активних форм кисню та NO призводить до апоптозу та подальшої дисфункції ендотелію (Saran U. et al., 2017).

Індукція та реалізація апоптозу вимагають взаємодії низки молекул, включаючи сигнальні молекули, рецептори, ензими та регуляторні білки. У механізмах апоптозу важлива сигнальна система каскаду каспаз, які є ефекторними молекулами програмованої смерті клітин. Зокрема, каспаза-3 відіграє важливу роль у реалізації як мітохондріального, так і рецепторного шляхів запуску апоптозу (Ming M. S., Kanneganti T. D., 2016; Марущак М. І., 2017). Оскільки оцінку вмісту каспази-3 вважають одним з основних методів визначення рівня апоптозу (Fan T. J. et al., 2005; Губский Ю. И., 2015), визначено її вміст у печінці мишей лінії BALB/c за умов АФС. Встановлено зростання вмісту активної форми каспази-3 (p17) в 1,5 та 2,9 раза у печінці невагітних та вагітних мишей з АФС порівняно з показниками тварин контрольних груп (рис. 5). Підвищення вмісту каспази-3, ймовірно, зумовлено активацією мітохондріального шляху апоптозу, який пов'язаний із надходженням проапоптогенних сигналів (Марущак М. І., 2017).

NO характеризується протективним ефектом на Fas-індукований апоптоз у гепатоцитах (Остапченко Л. І. та ін., 2010). Під впливом L-Arg у тканині печінки вагітних та невагітних мишей з АФС знижувався вміст каспази-3 (рис. 5). Ймовірно, механізми дії L-Arg пов'язані з індукцією синтезу білків

теплового шоку HSP32 та HSP70 під впливом NO, які пригнічують активність каспаз і стабілізують мембрани мітохондрій (Ferreira E. I. et al., 2017). NO може інгібувати мітохондріальний шлях апоптозу через блокування вивільнення проапоптичних білків (Остапченко Л. І. та ін., 2010). Активність каспази-3 інгібується її посттрансляційним S-нітрозилюванням, відповідно, інактивація каспази-3 цим шляхом пов'язана з пригніченням апоптозу (Saligram P. T. et al., 2014).

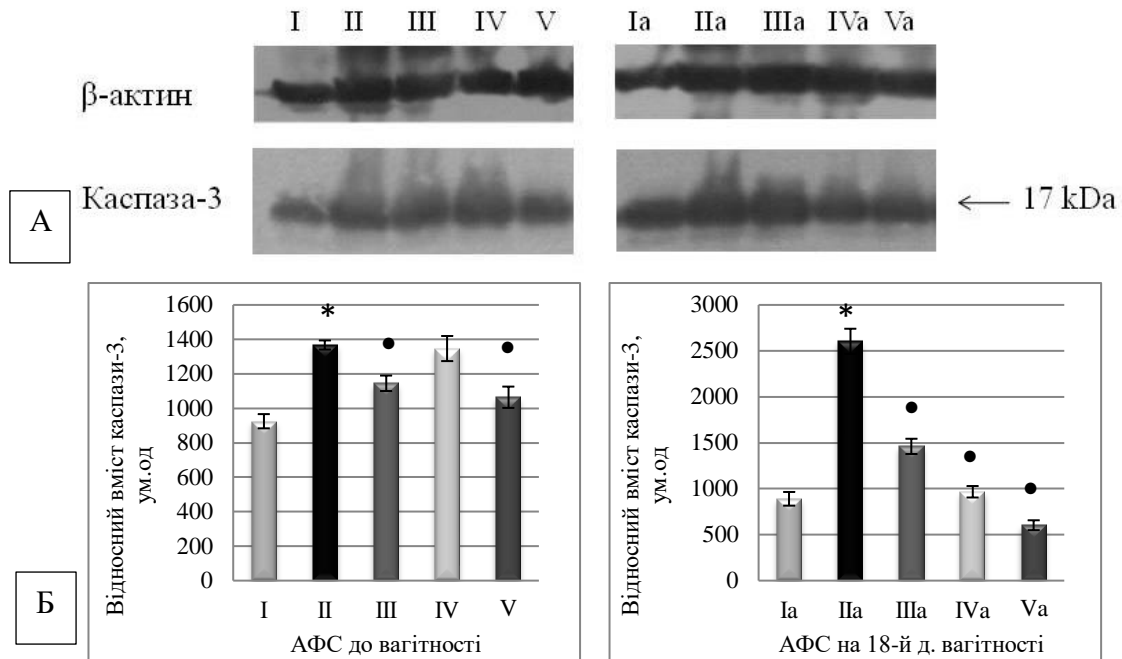


Рис. 5. Результати Вестерн-блот аналізу вмісту активної форми каспази-3 у печінці вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину: блотограма (А) та результати денситометрії (Б) ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Примітка. Умовні позначення груп тварин: I, Ia – контроль; II, IIa – антифосфоліпідний синдром (АФС); III, IIIa – АФС + L-Arg; IV, IVa – АФС + AG; V, Va – АФС + L-Arg + AG; \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

Як показали результати досліджень, введення мишам лінії BALB/c з АФС інгібітора iNOS AG не викликало достовірних змін вмісту каспази-3 у тканині печінки порівняно з показниками тварин з АФС (див. рис. 5). Водночас, з'ясовано, що введення AG вагітним мишам з АФС супроводжувалося зниженням вмісту каспази-3 на 63 % порівняно з показниками тварин із АФС на 18 день вагітності.

При комбінованому застосуванні L-Arg та AG за умов АФС у тканині печінки вагітних та невагітних мишей знижувався вміст каспази-3 (див. рис. 5). Результати досліджень показали, що за комбінованого введення L-Arg та AG вагітним мишам з АФС вміст каспази-3 був менший, ніж у тварин із цією патологією на 18 день вагітності, яким вводили окремо L-Arg чи AG.

Інгібування продукції NO призводить до пригнічення S-нітрозилювання Bcl-2 та сприяє загибелі апоптотичних клітин. Однак, вплив NO на проникність мітохондрій та вивільнення цитохрому c залежить від його концентрації. Низький рівень NO зменшує мітохондріальну проникність, тоді як вища, ніж фізіологічна, концентрація прискорює відкриття пор мітохондрій та вихід цитохрому c (Brookes P. S. et al., 2000, Azad N. et al., 2006). Таким чином, співвідношення між токсичними і захисними механізмами NO визначає його роль у механізмах розвитку апоптозу. Баланс між про- й антиапоптичними сигнальними механізмами, їх активація чи пригнічення в результаті синтезу NO супроводжуються або збереженням структури тканини, або загибеллю клітин внаслідок апоптозу (Ferreira E. I. et al., 2017).

***Вміст нейроспецифічних протеїнів у мозочку і півкулях великого мозку й аутоантитіл до протеїнів головного мозку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії L-аргініну й аміногуанідину.*** Антифосфоліпідні антитіла здатні впливати на проліферацію астроцитів (Насонов Е. Л., 2004). Враховуючи те, що GFAP бере участь у гліально-нейронній взаємодії, формуванні архітектури білої речовини, підтримці цілісності гематоенцефалічного бар'єру (Eng L. F. et al., 2000; Тихомиров А. О. та ін., 2016), доцільно було дослідити його вміст у структурах мозку за умов АФС. Вміст GFAP у мозочку та півкулях великого мозку мишей лінії BALB/c за умов АФС зростає, що свідчить про розвиток реактивного астрогліозу (рис. 6, 7). Отримані результати можна пояснити тим, що ушкодження нервової тканини індукує інтенсивну проліферацію та гіпертрофію астроцитів, прискорений синтез GFAP і фібрилогенез. Наявність більш низькомолекулярного поліпептиду GFAP (37 kDa) у зразках півкуль великого мозку та, більшою мірою, в тканині мозочка мишей лінії BALB/c за умов АФС, свідчить про перебудову проміжних філаментів цитоскелета астроцитів (Lee K. M., MacLean A. G., 2015; Тихомиров А. О. та ін., 2016).

Показано чутливість мозочка до введення L-Arg за умов АФС, що підтверджувалося подальшим зростанням вмісту GFAP у мозочку невагітних мишей з АФС, яким вводили L-Arg (рис. 6). Підвищена експресія GFAP характеризує активацію астроглії та гліоз під час нейродегенерації (Brahmachari S. et al., 2006). Водночас, за застосування L-Arg вагітним мишам з АФС в мозочку відзначено зменшення загального вмісту GFAP на 23 % та його ізоформи (37 kDa) на 71 % порівняно з показниками вагітних тварин із АФС. Ймовірно, вміст ізоформи GFAP (37 kDa) у вагітних мишей з АФС знижувався завдяки антиоксидантним властивостям L-Arg (Малахов В. А. и др., 2009). Серед досліджених відділів півкулі великого мозку виявилися менш чутливими, ніж мозочок, до дії L-Arg (рис. 7).

При АФС спостерігається підвищення вмісту iNOS у сироватці крові, яка може утворюватися і в активованій мікроглії (Dingman A. et al., 2006) та індукувати численні сигнальні шляхи і призводити до нейрозапалення (Song Y. et al., 2017). При введенні інгібітора iNOS AG невагітним та вагітним мишам лінії BALB/c з АФС в мозочку відмічено зниження загального вмісту GFAP на 30 і 26 % та його ізоформи (37 kDa) на 81 і 89 % відповідно (рис. 6).



Встановлено, що за введення AG тваринам із АФС у півкулях великого мозку зменшувався загальний вміст GFAP та його ізоформи (37 kDa) (рис. 7).

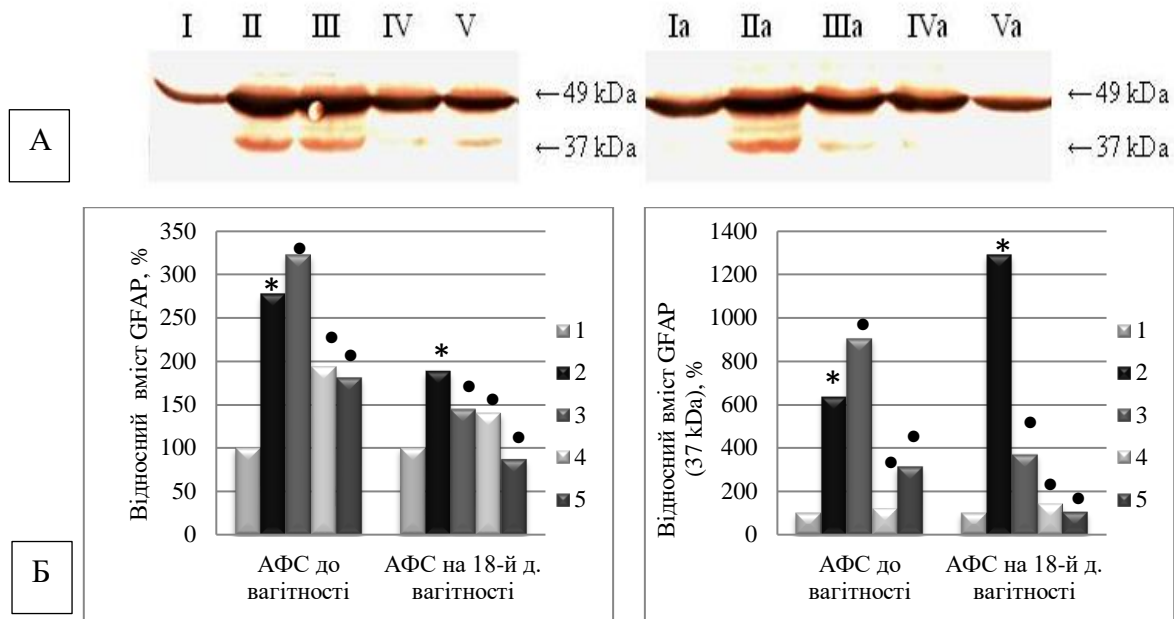


Рис. 6. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну в мозочку мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом до і на 18 день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Примітка. Умовні позначення груп тварин: 1 – контроль; 2 – антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-Arg; 4 – АФС + AG; 5 – АФС + L-Arg + AG. \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

Встановлено зниження загального вмісту GFAP та його ізоформи (37 kDa) у мозочку вагітних та невагітних мишей з АФС за комбінованого застосування L-Arg та AG відносно показників тварин із АФС (див. рис. 6). При порівнянні отриманих результатів у групі мишей з АФС, яким вводили L-Arg у комбінації з AG, і групі тварин із АФС, яким вводили окремо L-Arg, у мозочку встановлено зменшення загального вмісту GFAP на 44 % та його ізоформи (37 kDa) на 66 %. На 18 день вагітності за комбінованого введення L-Arg та AG у мозочку мишей з АФС спостерігали зниження загального вмісту GFAP на 40 і 38 % та його ізоформи (37 kDa) на 71 і 26 % порівняно з показниками вагітних тварин із цією патологією, яким вводили окремо L-Arg чи AG.

За комбінованого введення L-Arg та AG у тканині півкуль великого мозку мишей з АФС вміст ізоформи GFAP (37 kDa) знижувався відносно показників тварин із цією патологією (рис. 7). Вміст ізоформи GFAP (37 kDa) зменшувався на 25 % порівняно з показниками тварин з АФС, яким вводили окремо L-Arg. У півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС, яким вводили L-Arg у комбінації з AG, відзначено зниження загального вмісту GFAP та його

ізоформи (37 kDa) відносно показників вагітних тварин з АФС. При комбінованому застосуванні L-Arg та AG у півкулях великого мозку вагітних мишей з АФС загальний вміст GFAP та його ізоформи (37 kDa) зменшувався порівняно з показниками вагітних тварин із АФС, яким вводили окремо L-Arg чи AG. Не виключено, що NO через шлях GC-cGMP-PKG бере участь у регулюванні експресії GFAP в астроцитах (Brahmachari S. et al., 2006).

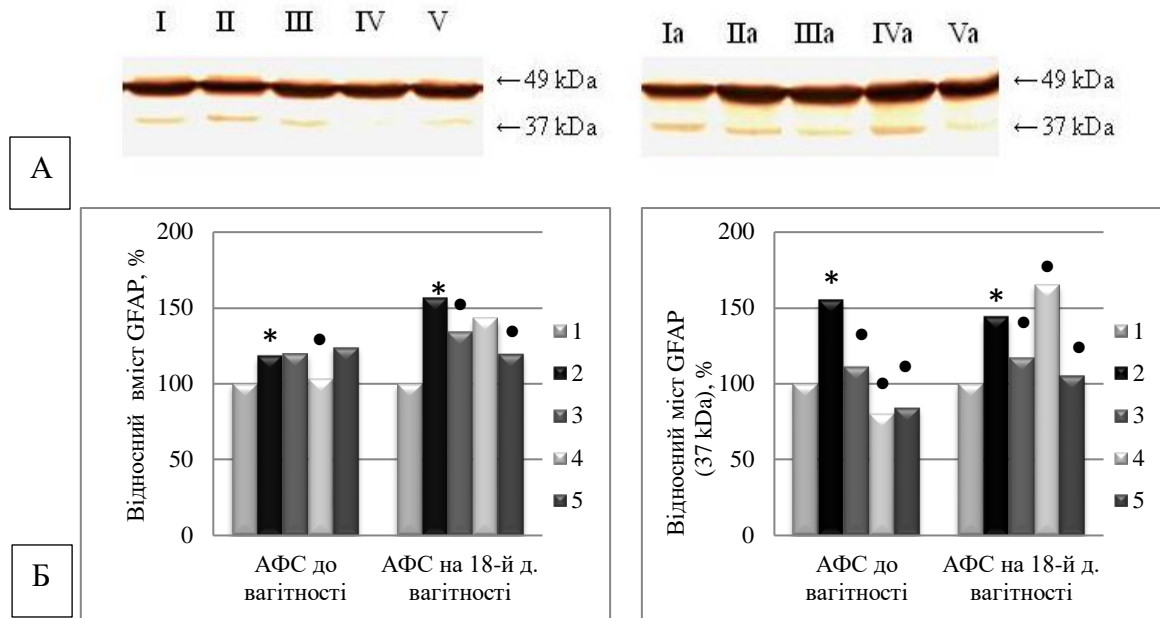


Рис. 7. Результати Вестерн-блот аналізу гліального фібрилярного кислого протеїну у півкулях великого мозку мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом до і на 18 день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину: блотограма (А) та результати денситометрії (Б). Дані наведено у відсотках від контролю (n=10)

Примітка. Умовні позначення груп тварин: 1 – контроль; 2 – антифосфоліпідний синдром (АФС); 3 – АФС + L-Arg; 4 – АФС + AG; 5 – АФС + L-Arg + AG. \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

Процеси ушкодження мозку пов'язують не тільки з порушенням структури та функцій астроцитів, а й олігодендроцитів, що впливає на стан мієлінової оболонки. Маркерним білком олігодендроцитів є МВР, який відіграє важливу роль в організації та підтриманні структурної цілісності мієліну (Patrikios P. et al., 2006; D'Aversa T. et al., 2013; Астахин А. В. и др., 2016).

Деструкція білої речовини мозку супроводжується вивільненням МВР з ураженої тканини, у зв'язку з чим рівень цього протеїну може бути чутливим індикатором ступеня тяжкості патологічного процесу. Проникаючи крізь гематоенцефалічний бар'єр, МВР та його фрагменти стимулюють синтез антитіл до компонентів мієліну, що підтримує перебіг захворювання (Patrikios P. et al., 2006).

Встановлено, що в мозочку невагітних та вагітних мишей за умов АФС рівень олігомерів МВР (95–110 kDa) збільшився в 5,3 і 5,7 рази порівняно

з показниками тварин контрольних груп. Імунореактивні зони в зразках півкуль великого мозку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з АФС, які виявлялися антитілами проти МВР (95–110 kDa), достовірно не відрізнялися порівняно з контролем. Водночас, встановлено значне зростання вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку мишей з АФС – у 256 разів, а у вагітних тварин із цією патологією – в 1935 разів. Ймовірно, отримані результати вказують на активацію процесів ремієлінізації в мишей з експериментальним АФС, що можна розглядати як компенсаторну відповідь на ушкодження (Астахин А. В. и др., 2016). Відомо, що клітини мозку здатні до відновлення ушкодженої структури мієліну на ранніх стадіях розвитку патології (Patrikios P. et al., 2006). Отримані дані можна пояснити тим, що розвиток запального процесу призводить до реактивації астроглії головного мозку (Kuipers H. F. et al., 2017).

Як показали результати досліджень, за застосування попередника NO L-Arg у мозочку вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з АФС не відбувалося достовірних змін вмісту МВР у діапазоні молекулярних мас 95–110 kDa порівняно з показниками тварин із цією патологією. Встановлено, що введення L-Arg не впливало на вміст олігомерних форм МВР (95–110 kDa) у півкулях великого мозку невагітних мишей з АФС, проте спостерігали подальше зростання вмісту субодиниці МВР (18,4 kDa) в 4,8 раза порівняно з показниками тварин із АФС. При введенні L-Arg мишам з АФС на 18 день вагітності у півкулях великого мозку знижувався вміст МВР (95–110 kDa) та МВР (18,4 kDa) порівняно з показниками вагітних тварин із цією патологією.

Встановлено, що у мозочку невагітних мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили AG, не відбувалося достовірних змін вмісту МВР (95–110 kDa) порівняно з показниками тварин із цією патологією. На 18 день вагітності в мозочку мишей з АФС, яким вводили AG, зареєстровано зниження вмісту МВР (95–110 kDa) на 43 % відносно показників вагітних тварин із цим синдромом. При застосуванні AG у тканині півкуль великого мозку невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c з АФС вміст МВР (18,4 kDa) зростав у 10 та 1,6 раза порівняно з показниками тварин із цією патологією.

За комбінованого застосування L-Arg та AG у мозочку вагітних мишей з АФС знижувався вміст МВР (95–110 kDa) відносно тварин із цією патологією. Встановлено, що при комбінованому використанні L-Arg та AG у мозочку вагітних мишей з АФС вміст МВР (95–110 kDa) зменшувався на 34 % порівняно з показниками тварин із АФС на 18 день вагітності, яким вводили L-Arg.

За комбінованого застосування L-Arg та AG у півкулях великого мозку вміст МВР (18,4 kDa) зростав у 13 разів порівняно з показниками мишей з АФС. При цьому він збільшувався у 2,7 раза відносно показників тварин із АФС, яким вводили тільки L-Arg. Введення L-Arg у комбінації з AG мишам з АФС на 18 день вагітності супроводжувалося зниженням вмісту МВР (95–110 kDa) у півкулях великого мозку і зростанням вмісту МВР (18,4 kDa) порівняно з показниками вагітних тварин із цим синдромом. Вміст МВР (18,4 kDa) збільшувався на 192 і 42 % відносно показників мишей з АФС на 18 день вагітності, яким вводили окремо L-Arg чи AG. Підсилення деградації МВР

у тварин з експериментальним АФС на фоні розвитку реактивного астрогліозу може бути одним із шляхів активної перебудови компонентів ушкоджених мієлінових оболонок (Kuipers H. F. et al., 2017). Астроцити можуть виконувати функції антигенопрезентуючих клітин, активуючи Т-лімфоцити, що відповідають за продукування антитіл до власного МВР. З іншого боку, клітини реактивної астроглії продукують численні фактори росту, які захищають олігодендроцити від апоптозу, деструкції речовини мієліну та демієлінізації (Kiray H. et al., 2016).

При ушкодженні білої речовини мозку за умов АФС можуть мати значення нейроспецифічні антитіла (Калашникова Л. А., Джамантаєва Б. Д., 2015). Важливе діагностичне значення має виявлення у сироватці крові аутоантитіл до протеїнів нервової тканини в жінок під час вагітності (Poletaev A. B., Morozov S. G., 2000; Соболев В. А. и др., 2004). Тому доцільно було дослідити вміст нейроспецифічних аутоантитіл у вагітних та невагітних мишей за умов АФС. Показано, що у сироватці крові мишей лінії BALB/с з АФС зростає вміст аутоантитіл у трьох поліпептидних зонах з такими величинами молекулярних мас: 120 kDa – в 1,5 раза, 150 kDa – у 2,5 раза, >170 kDa – у 2,4 раза відносно контролю (рис. 8).

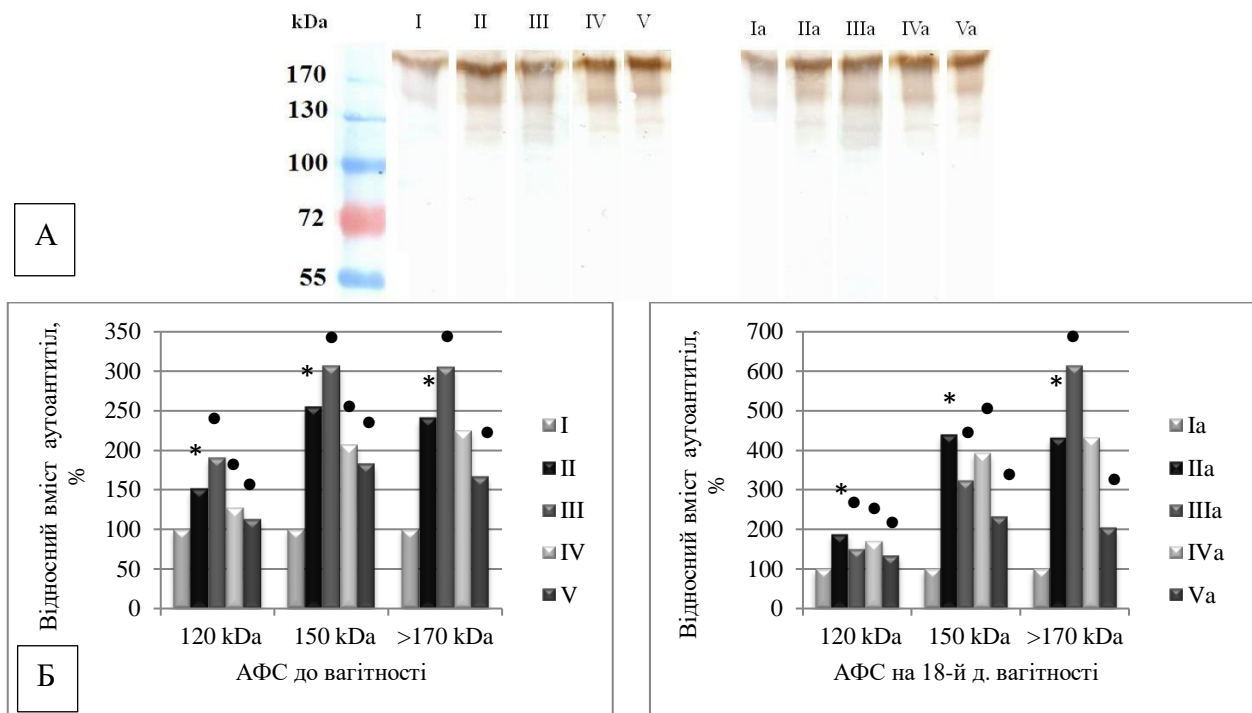


Рис. 8. Результати Вестерн-блот аналізу протеїнів головного мозку, що реагують з аутоантитілами мишей лінії BALB/с з антифосфоліпідним синдромом до і на 18 день вагітності та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину: блотограма (А) та результати денситометрії (Б)

Примітка. Умовні позначення груп тварин: I, Ia – контроль; II, IIa – антифосфоліпідний синдром (АФС); III, IIIa – АФС + L-Arg; IV, IVa – АФС + AG; V, Va – АФС + L-Arg + AG; \*вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі ( $p < 0,05$ ); •вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС ( $p < 0,05$ )

Встановлено, що у сироватці крові вагітних мишей з АФС збільшувався вміст аутоантитіл: з молекулярною масою 120 kDa – в 1,9 раза, 150 kDa – в 4,4 раза, >170 kDa – в 4,3 раза порівняно з аналогічними показниками вагітних тварин без АФС. Отримані результати свідчать про підвищення вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку в мишей лінії BALB/c з АФС. Ймовірно, ініціювальним фактором невиношування вагітності, розвитку фетоплацентарної недостатності й різноманітних вад розвитку плода при АФС може бути зростання продукції материнських аутоантитіл, оскільки антитіла класу імуноглобулінів G, проникають через плацентарний бар'єр, і їх вважають «ембріотропними» (Poletaev A. B., Morozov S. G., 2000; Соболев В. А. и др., 2004).

Результати денситометричного аналізу показали, що у сироватці крові тварин з АФС, яким вводили L-Arg, зростав вміст нейроспецифічних аутоантитіл. Проте, у сироватці крові вагітних мишей лінії BALB/c з АФС, яким вводили L-Arg, вміст аутоантитіл знижувався: з молекулярною масою 120 kDa – на 20 %, 150 kDa – на 23 %, а вміст аутоантитіл з молекулярною масою понад 170 kDa підвищувався на 43 % відносно показників вагітних тварин із АФС. При введенні AG у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС зменшувався вміст нейроспецифічних аутоантитіл з молекулярною масою 120 та 150 kDa порівняно з показниками тварин із АФС. За комбінованого введення L-Arg та AG мишам з АФС у сироватці крові знижувався вміст нейроспецифічних аутоантитіл.

***Механізми впливу L-аргініну й аміногуанідину на розвиток оксидативного стресу в мозочку, півкулях великого мозку, печінці та нирках за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.*** Однією з ланок, що беруть участь у патобіохімічних механізмах розвитку АФС, є оксидативний стрес (Alves J. D. et al., 2005; Perez-Sanchez C. et al., 2012). Встановлено, що в мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей за умов АФС відбувається активація вільнорадикальних процесів, про що свідчить збільшення вмісту ГПЛ і ТБК-АП. Інтенсифікація вільнорадикального окиснення поєднується з дискоординацією в системі прооксиданти – антиоксиданти, що призводить до розвитку оксидативного стресу (Колісник М. І. та ін., 2009; Говоруха О. Ю., Шнайдерман О. Ю., 2016). Враховуючи те, що джерелом електронів для одноелектронного відновлення молекулярного кисню з утворенням його активних форм найчастіше є дихальний ланцюг мітохондрій і мікросомальна система (Мещишен І. Ф., 1999), доцільно було дослідити активність ензимів електротранспортного ланцюга за умов АФС. Вказані зміни прооксидантно-антиоксидантного балансу супроводжуються зменшення активності мітохондріальних ензимів СДГ і ЦХО в мозочку та півкулях великого мозку порівняно з показниками тварин контрольних груп.

Розвиток оксидативного стресу за умов АФС спричиняє окисне пошкодження структури ДНК, білків та ліпідів (Segal B. M., 2012; Lopez-Pedreria Ch. et al., 2016). NO за цих умов бере участь як у вторинному пошкодженні головного мозку, так і у неврологічному відновленні (Bayir H.

et al., 2005). Оскільки введення субстрату для синтезу NO L-Arg мишам з АФС у мозочку призводить до подальшої активації оксидативного стресу, зниження активності ензимів антиоксидантного захисту (СОД, КАТ) та ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій (СДГ, ЦХО) порівняно з показниками тварин із АФС, то отримані результати опосередковано підтверджують ушкоджувальну роль надлишкового утворення NO у розвитку оксидативного і нітрооксидативного стресу в структурах центральної нервової системи. Проте, введення L-Arg вагітним мишам з АФС сприяло пригніченню активності процесів вільнорадикального окиснення мембранних ліпідів у мозочку. Про активацію системи антиоксидантного захисту в мозочку в цій групі свідчило підвищення активності СОД на 33 %, КАТ – на 26 %. Також спостерігали зростання активності мітохондріальних ензимів СДГ та ЦХО порівняно з показниками вагітних мишей з АФС. Можна припустити, що під час вагітності L-Arg використовується більшою мірою для забезпечення функціонування плода, матки, плаценти, оскільки у мозочку при введенні L-Arg вміст  $\text{NO}_2^-$  достовірно не змінювався, а вміст  $\text{NO}_3^-$  збільшувався незначно. Вплив NO може регулюватися його клітинною локалізацією та рівнем оксидативного стресу в тканині (Bayir H. et al., 2005).

Встановлено, що у півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей з АФС, яким вводили L-Arg відбувалося пригнічення активності процесів вільнорадикального окиснення мембранних ліпідів і активація системи антиоксидантного захисту, що супроводжувалося підвищенням активності СОД, КАТ та вмісту G-SH. Ймовірно, реактивні астроцити захищають нейрони від ушкодження, включаючи захист від оксидативного стресу за рахунок активації таких механізмів, як синтез глутатіону, секреція нейропротекторних факторів, відновлення проникності гематоенцефалічного бар'єру і зменшення вазогенного набряку (Ушакова Г. О. та ін., 2017). Також, не виключено, що позитивний вплив L-Arg на показники оксидативного стресу в головному мозку вагітних мишей з АФС відбувається через його антиоксидантні властивості, які описано при різних патологічних процесах (Степанов Ю. М. и др., 2004).

AG за умов експериментального АФС проявляє антиоксидантні властивості, його дія спрямована на відновлення показників про-/антиоксидантного статусу, активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій у мозочку і півкулях великого мозку порівняно з показниками тварин із АФС. Отримані результати можна пояснити тим, що нейропротекторний ефект AG проявляється через інгібування iNOS (Danielisova V. et al., 2011). Проте, механізми дії AG можуть реалізовуватися і через пригнічення утворення активних форм кисню, інгібування пероксидації ліпідів і запобігання реалізації процесів апоптозу, зменшуючи розвиток оксидативного стресу (Danielisova V. et al., 2011; Genc H. et al., 2017).

Враховуючи те, що при АФС виникає відносна недостатність NO на фоні активації iNOS, наступним завданням дослідження було встановлення можливості підвищення нейропротекторного впливу AG за умов комбінованого

застосування з L-Arg. За комбінованого введення L-Arg та AG вагітним та невагітним тваринам з АФС в мозочку та півкулях великого мозку оксидативний стрес пригнічувався більшою мірою, ніж за окремого введення L-Arg чи AG. На основі отриманих результатів серед механізмів реалізації дії L-Arg та AG, при їх комбінованому застосуванні, за умов АФС слід відзначити вплив на розвиток оксидативного стресу в головному мозку мишей через пригнічення активності процесів ліпопероксидації (зниження вмісту ГПЛ, ТБК-АП), активацію системи антиоксидантного захисту (підвищення активності СОД, КАТ і вмісту G-SH), нормалізацію активності ензимів тканинного дихання (зростання активності СДГ, ЦХО) в мозочку та півкулях великого мозку.

Оскільки при АФС порушуються функції внутрішніх органів, було також досліджено механізми впливу модуляторів системи NO на перебіг оксидативного стресу в печінці вагітних та невагітних мишей за умов АФС. У печінці тварин із АФС відбувалася активація вільнорадикальних процесів, збільшувався вміст ГПЛ на 52 % і ТБК-АП на 36 % відносно показників контролю (табл.). Водночас, встановлено компенсаторне зростання активності СОД на 45 % і КАТ на 26 %, та зниження вмісту G-SH у печінці мишей з АФС порівняно з показниками тварин контрольної групи. Відомо, що збільшення продукування супероксидного аніон-радикалу на початкових етапах розвитку оксидативного стресу може індукувати підвищення активності СОД (Колісник М. І. та ін., 2009). Зниження вмісту G-SH може бути пов'язано як з інтенсифікацією процесів ліпопероксидації, так і з підсиленням катаболізму глутатіону (Мещишен І. Ф., 1999; Бєленічев І. Ф. та ін., 2002). Встановлено зменшення активності СДГ на 24 % та ЦХО на 39 % у печінці тварин з АФС відносно контролю. Пероксидне окиснення ліпідів є одним із факторів ендотеліальної дисфункції при АФС (Stanisavljevic N. et al., 2016). У печінці вагітних тварин із АФС також спостерігали порушення дисбалансу компонентів системи прооксиданти – антиоксиданти та розвиток оксидативного стресу. Про розвиток цитолізу у печінці свідчило зростання активності аланінамінотрансферази (у 2,1 та 2,6 раза) та аспартатамінотрансферази (у 2,6 та 1,9 раза) у сироватці крові невагітних та вагітних мишей з АФС, порівняно із показниками контрольних груп.

У печінці мишей з АФС, яким вводили L-Arg, відмічено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів, що проявлялося зниженням вмісту ГПЛ. Водночас, встановлено тенденцію до нормалізації активності СОД, КАТ і вмісту G-SH порівняно з показниками мишей з АФС. Під впливом L-Arg зростала активність СДГ та ЦХО у печінці відносно тварин із АФС. У печінці вагітних мишей з АФС, яким вводили L-Arg, знижувався вміст ГПЛ і ТБК-АП, підвищувалися активність СОД у 2,2 раза, КАТ в 1,7 раза та вміст G-SH. Під впливом L-Arg у печінці також зростала активність мітохондріальних ензимів СДГ на 24 % та ЦХО на 42 % порівняно з показниками тварин із цією патологією на 18 день вагітності. Ймовірно, протекторний вплив L-Arg на показники оксидативного стресу в печінці мишей з АФС відбувається через його антиоксидантні властивості (Степанов Ю. М. и др., 2004).



**Показники системи прооксиданти – антиоксиданти у печінці вагітних мишей лінії BALB/c за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні L-аргініну й аміногуанідину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Показник	Група тварин				
	ГПЛ, ум. од./г тканини	ТБК-АП, нмоль/г тканини	СОД, ум. од./мг протеїну	КАТ, нмоль/хв·мг протеїну	G-SH, мкмоль/г тканини
Контроль	7,71±0,49	4,35±0,17	3,27±0,23	14,11±1,16	3,04±0,30
АФС	11,47±0,56 $p < 0,01$	9,06±0,81 $p < 0,001$	1,14±0,08 $p < 0,001$	6,20±0,61 $p < 0,001$	1,11±0,07 $p < 0,001$
АФС + L-аргінін	9,9±0,28 $p_1 < 0,05$	6,92±0,25 $p_1 < 0,05$	2,48±0,13 $p_1 < 0,001$	10,26±1,00 $p_1 < 0,05$	1,75±0,08 $p_1 < 0,001$
АФС + аміногуанідин	10,7±0,49 $p_1 > 0,05$	7,81±0,60 $p_1 > 0,05$	1,31±0,07 $p_1 > 0,05$	7,27±0,65 $p_1 > 0,05$	1,28±0,09 $p_1 > 0,05$
АФС + L-аргінін + аміногуанідин	8,5±0,43 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	5,72±0,29 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,05$	2,84±0,07 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$	13,79±0,90 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$	2,04±0,07 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$

Примітка.  $p_1$  – вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у контрольній групі;  $p_2$  – вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС, яким вводили L-аргінін;  $p_3$  – вірогідна різниця порівняно з відповідними значеннями у групі тварин з АФС, яким вводили аміногуанідин

При розвитку оксидативного стресу супероксидний аніон-радикал швидко зв'язує та інактивує NO (Lopez-Pedreira Ch. et al., 2016). Проте, можливо, механізми впливу L-Arg на розвиток оксидативного стресу в печінці реалізуються опосередковано через постачання субстрату для бісинтезу NO, оскільки спостерігали зниження вмісту  $\text{NO}_2^-$  у печінці невагітних мишей за умов АФС на 13 %, на 18 день вагітності – на 68 %. Отримані результати вказують на виникнення відносної недостатності NO на рівні внутрішньо-печінкової мікроциркуляції на фоні загального гіперпродукування NO. У печінці мишей з АФС до і при вагітності, яким вводили L-Arg, зростав вміст  $\text{NO}_2^-$  (на 39 і 92 %) та  $\text{NO}_3^-$  (на 45 і 19 %) відносно показників тварин із цією патологією. NO внаслідок своєї високої реакційної здатності з іншими вільними радикалами також діє як потужний антиоксидант. Взаємодія NO з ліпідними пероксильними радикалами призводить до ефективного пригнічення пероксидного окиснення ліпідів (Bayir H. et al., 2005; Лавришин Ю. Ю. та ін., 2016).

Встановлено, що у печінці тварин з АФС, яким вводили AG, відзначено пригнічення вільнорадикального окиснення. Введення AG не викликало достовірних змін показників системи антиоксидантного захисту в печінці мишей з АФС відносно тварин із цією патологією без корекції. Водночас, спостерігали підвищення активності ЦХО порівняно з показниками мишей з АФС. У печінці вагітних тварин за умов АФС введення AG не впливало на процеси розвитку оксидативного стресу.



При комбінованому введенні L-Arg та AG вагітним та невагітним мишам за умов АФС підвищувалася гепатопротекторна активність L-Arg на фоні інгібування iNOS. У цій групі більшою мірою відбувалися зменшення проявів оксидативного стресу, зниження активності процесів ліпопероксидації, підвищення активності та вмісту компонентів системи антиоксидантного захисту й активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій печінки та зниження активності аланінамінотрансферази та аспартатаміно-трансферази.

Нирки є одним з основних органів-мішеней при АФС (Tektonidou M. G., 2012). Встановлено, що в нирках вагітних та невагітних мишей з АФС відбувалася активація оксидативного стресу, що проявлялося порушенням дисбалансу в системі прооксиданти – антиоксиданти та процесів тканинного дихання. Не виключено, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів, у тому числі, знижується енергозабезпечення клітин унаслідок ушкодження мітохондрій (Iuliano L. et al., 1997). Встановлено зростання вмісту сечовини (в 1,8 та 2,0 раза) та креатиніну (в 1,9 та 2,2 раза) у сироватці крові невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c з АФС відносно показників контрольних груп, що свідчить про порушення видільної функції нирок.

При введенні L-Arg мишам з АФС встановлено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у нирках: зниження вмісту ГПЛ і ТБК-АП порівняно з показниками тварин з АФС. Зростала активність мітохондріальних ензимів СДГ і ЦХО відносно показників мишей з АФС. Відновлення балансу в системі прооксиданти – антиоксиданти у нирках вагітних мишей з АФС, яким вводили L-Arg, супроводжувалося підвищенням активності ензимів мітохондрій СДГ на 21 % та ЦХО на 42 %.

Встановлено, що у нирках мишей з АФС, яким вводили AG, збільшувалися вміст ГПЛ, G-SH та активність СОД, тоді як активність КАТ зменшувалася порівняно з показниками тварин із цією патологією. При введенні AG вагітним мишам з АФС у нирках зростав вміст ТБК-АП з одночасним підвищенням активності КАТ на 21 %, ЦХО на 26 % і вмісту G-SH на 30 % відносно аналогічних показників вагітних тварин із цим синдромом. Таким чином, у мишей з АФС, яким вводили AG, спостерігається подальша інтенсифікація вільнорадикального окиснення, що, водночас, поєднується з активацією антирадикального та антиоксидантного захисту.

Максимально позитивний вплив модуляторів NO відзначено за умов комбінованого введення L-Arg та AG вагітним та невагітним тваринам з АФС, що супроводжувалося зниженням вмісту сечовини та креатиніну в сироватці крові, зменшенням проявів вільнорадикального окиснення у нирках, зниженням активності процесів пероксидного окиснення ліпідів, підвищенням активності та вмісту компонентів системи антиоксидантного захисту й ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій. Результати досліджень показали, що за комбінованого введення L-Arg та AG знижувалися вміст ТБК-АП на 29 %, активність СОД на – 23 %, зростала активність КАТ на 24 %, СДГ – на 11 % порівняно з аналогічними показниками мишей з АФС, яким вводили окремо AG. Встановлено, що за комбінованого застосування L-Arg та AG у нирках вагітних

тварин із цією патологією зменшувався вміст ГПЛ на 20 %, ТБК-АП – на 48 %, збільшувалися активність СОД на 48 %, КАТ – на 38 %, СДГ – на 12 %, ЦХО – на 38 % і вміст G-SH – на 17% відносно показників вагітних мишей з АФС, яким вводили AG.

***Морфологічні та субмікроскопічні зміни у печінці та нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні L-аргініну й аміногуанідину.*** За АФС відмічено значні гемодинамічні розлади з проявами тромбозу в печінці та нирках, що супроводжувалися деструктивно-дегенеративними змінами їх структурних компонентів. На фоні порушення мікроциркуляції ушкоджувалася ультраструктура ендотеліоцитів, гепатоцитів та епітеліоцитів ниркових тілець і каналців нефрона, виявлено дестабілізацію і деструкцію їх плазматичних та цитоплазматичних мембран.

Встановлено помірне кровонаповнення як венозних, так і артеріальних судин печінки мишей з АФС, за комбінованого застосування L-Arg та AG. Відновлюється впорядковане розташування гепатоцитів у складі часточок органа. Цитоплазма гепатоцитів однорідна, незначно набрякла, помірно оксифільна. Ядра клітин збільшені, нормохромні, виявляють ядерця. Зростає частка двоядерних гепатоцитів як прояв регенераторних процесів у печінці тварин цієї групи спостереження. Синусоїди помірно розширені, стінка чітко контурована, в їх просвітах виявляють поодинокі еритроцити. Ультраструктурно в цій серії спостерігається найбільш значний позитивний вплив на компоненти печінки експериментальних тварин. Ядра клітин округлі, мембрани каріолеми добре контуровані, перинуклеарний простір різномірний, не розширений. Мітохондрії збережені без ознак порушення їх ультраструктури, матрикс помірно осміофільний, кристи добре структуровані. Канальці та цистерни комплексу Гольджі не розширені, виявляють вільні рибосоми в складі полісом та фіксовані до мембран ендоплазматичної сітки, поодинокі по всій площі клітин спостерігають первинні лізосоми. Жовчні капіляри не розширені, мають чітко виражені мембрани, збережені мікроворсинки та міжклітинні контакти, що їх обмежують.

Під час гістологічного дослідження нирки мишей з АФС при комбінованому застосуванні L-Arg та AG виявлено найменші зміни деструктивного характеру, спостерігали відносну нормалізацію судинного компонента органа, залишалися кровонаповненими тільки міжчасткові та міжчасточкові вени порівняно з тваринами з АФС, яким вводили окремо L-Arg чи AG. При ультраструктурному дослідженні спостерігали відновлення компонентів нефрона. Кровоносні капіляри судинних клубочків мають неширокі просвіти, в яких наявні поодинокі еритроцити, лейкоцити. Цитоплазма ендотеліальних клітин помірно осміофільна, ядра округло-овальні або видовжені, мембрани каріолеми чітко виражені, добре структуровані. Периферичні ділянки цитоплазми містять багато мікропіноцитозних міхурців, кавеол, добре контуровані фенестри. Базальна мембрана суцільна, тришарова, без ознак набряку та потовщення. Ультраструктура цитотрабекул збережена, від них відгалужуються невисокі цитоподії, між якими наявні вузькі проміжки. Під час дослідження каналців нефрона у тварин з АФС, яким вводили L-Arg

та AG, спостерігали відновлення ультраструктурної організації епітеліальних клітин. Складки мембран плазмолемі базальної частини клітин чітко виражені, між ними розміщені впорядковано мітохондрії. Базальна мембрана збережена, чітка, не потовщена.

Таким чином, доведено важливу роль системи нітроген оксиду в механізмах розвитку антифосфоліпідного синдрому та його ускладнень. Встановлено, що модулятори синтезу NO (L-аргінін та аміногуанідин), особливо за умов їх комбінованого застосування, зменшують ступінь порушень, які спостерігають при антифосфоліпідному синдромі.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення та запропоновано нове вирішення актуальної наукової проблеми, що полягає у встановленні механізмів розвитку антифосфоліпідного синдрому у тварин, в тому числі під час вагітності, й ефективності застосування модуляторів синтезу нітроген оксиду L-аргініну та аміногуанідину. Експериментально обґрунтовано доцільність використання попередника нітроген оксиду L-аргініну в комбінації із інгібітором індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду аміногуанідином з метою корекції виявлених порушень при антифосфоліпідному синдромі.

За результатами проведеного дослідження зроблено такі висновки:

1. При антифосфоліпідному синдромі у мишей лінії BALB/c встановлено відносну недостатність нітроген оксиду, який утворюється під впливом ендотеліальної ізоформи синтази, на фоні загального гіперпродукування нітроген оксиду. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину невагітним та вагітним мишам за антифосфоліпідного синдрому переважає за своїм позитивним впливом їх окреме введення, що супроводжується зростанням вмісту ендотеліальної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 1,4 і 2,2 раза) та печінці (у 2,4 і 4,1 раза) з одночасним зниженням вмісту індукцйбельної ізоформи синтази нітроген оксиду у сироватці крові (в 3,2 і 3,8 раза) та печінці (у 2,3 і 3,3 раза) та нормалізацією вмісту нітриту та нітрат-аніонів у сироватці крові, печінці, нирках, мозочку, півкулях великого мозку.

2. Встановлено, що у крові невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів зростає в 1,6 раза, відносно інтактних, а у вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом в 2,4 раза порівняно з показниками вагітних тварин без антифосфоліпідного синдрому. Окреме введення L-аргініну та в комбінації з аміногуанідином нормалізує кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів у крові вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом.

3. У крові самок з антифосфоліпідним синдромом зростає концентрація фібриногену, вкорочуються активований частковий тромбопластиновий час, знижується міжнародне нормалізоване відношення, що супроводжується зменшенням кількості тромбоцитів. Введення L-аргініну вагітним та невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом відновлює показники системи

гемостазу, а аміногуанідин спричиняє прогресування патологічних змін системи зсідання крові, які свідчать про зростання схильності до тромбоутворення. Комбіноване введення модуляторів синтезу нітроген оксиду L-аргініну з аміногуанідином у невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом сприяє зростанню кількості тромбоцитів відповідно на 53 та 39 %, зниженню концентрації фібриногену відповідно на 18 та 25 %. Встановлено, що у вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом, яким вводили L-аргінін у комбінації з аміногуанідином, відбувається подовження активованого часткового тромбoplastинового часу на 59 % та зростання міжнародного нормалізованого відношення на 15 %, порівняно з показниками вагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом без введення вказаних препаратів.

4. За експериментального антифосфоліпідного синдрому у мишей підвищується концентрація прозапальних цитокінів (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) та знижується вміст протизапальних цитокінів (IL-4, IL-10) у сироватці крові. Введення L-аргініну невагітним та вагітним мишам при антифосфоліпідному синдромі знижує у сироватці крові концентрацію цитокінів IL-1 $\beta$  (на 30 та 13 %), IL-6 (на 16 та 41 %), TNF- $\alpha$  (на 59 та 15 %) і підвищує вміст цитокінів IL-4 (на 35 та 29 %), IL-10 (на 25 та 18 %). Застосування невагітним і вагітним самкам із антифосфоліпідним синдромом аміногуанідину знижує концентрацію цитокіну TNF- $\alpha$  в сироватці крові в 1,6 й 1,4 раза й підвищує концентрацію цитокіну IL-4 в 1,2 раза. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину посилює позитивний вплив L-аргініну на цитокіновий профіль крові мишей з антифосфоліпідним синдромом.

5. Встановлено, що у крові невагітних і вагітних мишей за антифосфоліпідного синдрому збільшується кількість гранулоцитів і спостерігається дефіцит продукування активних форм оксигену в гранулоцитах та агранулоцитах, а у печінці зростає вміст каспази-3 відповідно в 1,5 і 2,9 раза. L-аргінін та аміногуанідин окремо та за комбінованого введення вагітним та невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом відновлюють рівновагу між кількістю гранулоцитів та агранулоцитів крові до рівня контролю і нормалізують вміст активних форм оксигену в гранулоцитах та агранулоцитах. Під впливом L-аргініну вміст каспази-3 в печінці вагітних та невагітних тварин із антифосфоліпідним синдромом знижується відповідно на 16 та 44 %. Введення аміногуанідину невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом не викликає достовірних змін вмісту каспази-3, а у групі вагітних тварин супроводжується зниженням вмісту каспази-3 на 63 %. При комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину вміст каспази-3 в печінці мишей з антифосфоліпідним синдромом нормалізується.

6. Встановлено зростання загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку невагітних та вагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом у 2,8 й 1,9 раза та його ізоформи (37 kDa) – у 6,4 і 12,9 раза. За даної патології у зразках півкуль великого мозку вагітних та невагітних тварин загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну збільшується, відповідно, в 1,2 й 1,6 раза, а вміст його ізоформи (37 kDa) – в 1,6 та 1,4 раза. Введення L-аргініну невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом підвищує загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну і його

ізоформи (37 kDa) в мозочку, та знижує їх рівень у вагітних мишей. Аміногуанідин сприяє зменшенню загального вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну і його ізоформи (37 kDa) в мозочку та півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом. При комбінованому застосуванні L-аргініну й аміногуанідину в мозочку вагітних та невагітних мишей з антифосфоліпідним синдромом знижується загальний вміст гліального фібрилярного кислого протеїну і його ізоформи (37 kDa), у півкулях великого мозку даний ефект відмічено тільки у вагітних тварин із антифосфоліпідним синдромом.

7. У мозочку невагітних та вагітних мишей лінії BALB/c за антифосфоліпідного синдрому збільшується вміст олігомерних форм основного протеїну мієліну (95–110 kDa) у 5,3 та 5,7 раза, порівняно із показниками контролю. У мозочку вагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом при окремому введенні аміногуанідину встановлено зниження вмісту основного протеїну мієліну (95–110 kDa) на 43 %, а при комбінованому застосуванні L-аргініну та аміногуанідину – на 31 %, порівняно із показниками вагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом.

8. Встановлено зростання вмісту субодиниці основного протеїну мієліну (18,4 kDa) у зразках півкуль великого мозку вагітних та невагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом. Окреме та комбіноване застосування L-аргініну та аміногуанідину за вказаної патології підвищує вміст субодиниці основного протеїну мієліну (18,4 kDa) у півкулях великого мозку вагітних та невагітних мишей. Позитивний вплив комбінованого застосування L-аргініну та аміногуанідину мишам з антифосфоліпідним синдромом найбільшою мірою проявляється на 18 день вагітності та супроводжується зниженням у півкулях великого мозку вмісту олігомерних форм основного протеїну мієліну (95–110 kDa) на 24 % та зростанням вмісту субодиниці основного протеїну мієліну (18,4 kDa) на 133 %, порівняно з показниками вагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом без застосування препаратів.

9. За антифосфоліпідного синдрому у мишей збільшується вміст аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa та >170 kDa). L-аргінін у невагітних мишей лінії BALB/c з антифосфоліпідним синдромом збільшує вміст аутоантитіл до протеїнів головного мозку в трьох поліпептидних зонах (120 kDa, 150 kDa, >170 kDa), а у вагітних мишей знижує вміст аутоантитіл з молекулярною масою 120 та 150 kDa і підвищує з молекулярною масою >170 kDa. Аміногуанідин, у разі його окремого введення і при комбінованому застосуванні з L-аргініном, сприяє зменшенню вмісту антитіл до власних протеїнів головного мозку у вагітних та невагітних тварин з антифосфоліпідним синдромом.

10. При антифосфоліпідному синдромі вагітних та невагітних мишей у тканинах печінки, нирок мозочка і півкуль великого мозку активуються процеси вільнорадикального окиснення, порушується рівновага в системі прооксиданти – антиоксиданти, що супроводжується накопиченням продуктів вільнорадикального окиснення (гідропероксидів ліпідів, ТБК-активних продуктів), дискоординацією активності та вмісту компонентів системи антиоксидантного захисту (супероксиддисмутази, каталази, відновленого

глутатіону) й компонентів електронотransпортного ланцюга мітохондрій (сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази). Введення L-аргініну мишам при антифосфоліпідному синдромі покращує антиоксидантні, гепато- і нефропротекторні властивості, а аміногуанідину – сприяє зменшенню оксидативного стресу в мозочку та півкулях великого мозку. У печінці та нирках мишей з антифосфоліпідним синдромом аміногуанідин посилює процеси вільнорадикального окиснення, що поєднується з активацією антирадикального й антиоксидантного захисту. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом відновлює баланс у системі прооксиданти – антиоксиданти та активність ферментів тканинного дихання.

11. Антифосфоліпідний синдром характеризується розладами мікроциркуляції і порушенням транскапілярного обміну з проявами тромбозу у печінці та нирках, що супроводжуються ушкодженням ультраструктури ендотеліоцитів, гепатоцитів та епітеліоцитів ниркових тілець і каналців нефрона, дестабілізацією і деструкцією їх плазматичних та цитоплазматичних мембран. Встановлено протекторний вплив L-аргініну та аміногуанідину при їх окремому та комбінованому введенні мишам при антифосфоліпідному синдромі, що відновлює процеси мікроциркуляції в печінці та нирках, структурні компоненти часточок печінки, ниркових тілець та епітеліоцитів каналців нефрона нирки, зменшує ушкодження мембранних органел, мембран ендотеліоцитів, гепатоцитів та нефроцитів.

12. Комбіноване введення L-аргініну та аміногуанідину вагітним та невагітним мишам з антифосфоліпідним синдромом нормалізує рівень нітроген оксиду у сироватці крові, печінці, нирках, мозочку, півкулях великого мозку, кількість циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів, відновлює показники системи гемостазу і баланс про- та протизапальних цитокінів у сироватці крові, пригнічує процесів реалізації апоптозу та некрозу у лейкоцитах крові та гепатоцитах. L-аргінін та аміногуанідин при комбінованому застосуванні за антифосфоліпідному синдромі мишей проявляють нейро-, гепато- і нефропротекторну активність, що підтверджується зменшенням у сироватці крові вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку, сечовини та креатиніну, активності аланінамінотрансферази та аспартатамінотрансферази, пригніченням розвитку реактивного астрогліозу та активацією процесів ремієлінізації у мозочку та півкулях великого мозку, пригніченням розвитку оксидативного стресу, відновленням активності ензимів електронотransпортного ланцюга мітохондрій у печінці, нирках, мозочку та півкулях великого мозку.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

### **Статті у наукових фахових виданнях України**

1. Яремчук О. З. Дослідження деяких показників гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Медична та клінічна хімія. 2015. Т. 17. № 3. С. 76–79.

2. Яремчук О. З. Патобіохімічні механізми ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Вісник проблем біології і медицини. 2015. Вип. 4. Т. 1 (124). С. 167–170.

3. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Брик А. Р., Куліцька М. І., Кузьмак І. П., Мехно Н. Я. Показники прооксидантно-антиоксидантної системи печінки при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні L-аргініну. Медична та клінічна хімія. 2017. Т. 19. № 3. С. 63–70. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

4. **Yaremchuk O. Z.**, Posokhova K. A., Kuzmak I. P., Kulitska M. I., Shevchuk O. O., Volska A. S., Lykhatskyi P. H. Influence of nitric oxide synthesis modulators on the cytokines profile in experimental antiphospholipid syndrome. International Journal of Medicine and Medical Research. 2019. Vol. 2. P. 113–121. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

5. Яремчук О. З. Стан прооксидантно-антиоксидантної системи нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та за дії модуляторів синтезу оксиду азоту. Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21. № 3. С. 85–91.

6. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Токарський О. С. Вплив L-аргініну на рівень синтезу оксиду азоту та вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у головному мозку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія Біологія. 2019. № 3 (77). С. 39–45. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

7. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Кузьмак І. П. Вплив L-аргініну та AG на рівень синтезу оксиду азоту в мозочку та великих півкулях головного мозку за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21. № 4. С. 105–112. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

8. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Летняк Н. Я. Дослідження вмісту каспази-3 у тканині печінки за умов антифосфоліпідного синдрому та при застосуванні модуляторів синтезу оксиду азоту. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2019. № 4. С. 167–175. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

9. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Габор Г. Г., Гузик М. М. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на механізми розвитку апоптозу та продукцію активних форм Оксигену у лейкоцитах крові при антифосфоліпідному синдромі в експерименті. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія.

2019. № 4 (88). С. 53–62. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

10. Яремчук О. З. Вплив L-аргініну та AG на вміст каспази-3 та  $\beta$ -актину при акушерському антифосфоліпідному синдромі в експерименті. Вісник проблем біології і медицини. 2020. Вип. 1 (155). С. 215–218.

11. Яремчук О. З. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на показники гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Медична та клінічна хімія. 2020. Т. 22. № 1. С. 99–106.

12. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Гузик М. М. Вплив аміногуанідину на вміст гліального фібрилярного кислого протеїну у мозочку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2020. № 1 (89). С. 36–43. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

13. **Яремчук О. З.**, Небесна З. М., Крамар С. Б., Посохова К. А. Морфологічні зміни у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі та застосуванні модуляторів синтезу оксиду азоту. Здобутки клінічної та експериментальної медицини. 2020. № 1. С. 208–215. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

**Статті у наукових виданнях,  
включених до міжнародних наукометричних баз даних  
Scopus/Web of Science**

14. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Куліцька М. І. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Світ медицини та біології. 2018. № 3 (65). С. 210–214. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

15. **Yaremchuk O. Z.**, Posokhova K. A. Content of GFAP in the Brain of BALB/C Mice with the Antiphospholipid Syndrome: Effects of L-Arginine and Aminoguanidine. Neurophysiology. 2019. Vol. 51 (6). P. 409–415. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

16. **Яремчук О. З.**, Посохова Е. А., Бандас І. А., Курило К. І., Цибульська Л. С. Исследование основного протеина миелина в ткани головного мозга мышей BALB/c при экспериментальном антифосфолипидном синдроме и при действии модуляторов синтеза оксида азота. Georgian Medical News. 2019. Vol. 12 (297). P. 135–140. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*



*експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

17. **Yaremchuk O. Z.**, Posokhova K. A., Kuzmak I. P., Kulitska M. I., Klishch I. M., Korda M. M. Indexes of nitric oxide system in experimental antiphospholipid syndrome. *Ukrainian Biochemistry Journal*. 2020. Vol. 92 (1). P. 75–83. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

18. Yaremchuk O. Z. Contents of Myelin Basic Protein and Autoantibodies against Brain Proteins in the Experimental Antiphospholipid Syndrome. *Neurophysiology*. 2020. Vol. 52 (2). P. 116–123.

19. **Яремчук О. З.**, Посохова Е. А., Лихацкий П. Г., Летняк Н. Я., Кулицкая М. И., Кузьмак И. П., Лисничук Н. Е., Делибашвили Д. Г. Продукция активных форм кислорода и развитие апоптоза в лейкоцитах крови при экспериментальном антифосфолипидном синдроме. *Georgian Medical News*. 2020. Vol. 2 (299). P. 120–125. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

20. **Яремчук О. З.**, Сорока Ю. В., Кулицкая М. И., Кузьмак И. П., Черняшова В. В., Наморадзе М. Ш., Делибашвили Д. Г., Посохова Е. А. Нейропротекторный эффект аминогуанидина при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности. *Georgian Medical News*. 2020. Vol. 4 (301). P. 159–165. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

21. **Yaremchuk O. Z.**, Posokhova K. A., Lykhatskyi P. H., Letniak N. Ya., Moseychuk I. P. L-arginine and aminoguanidine effect on the cytokine profile in obstetric antiphospholipid syndrome. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2020. Vol. 11 (1). P. 136–139. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

### **Статті у наукових виданнях інших держав**

22. **Яремчук О. З.**, Посохова Е. А. Влияние L-аргинина и аминогуанидина на некоторые биохимические показатели состояния печени при экспериментальном антифосфолипидном синдроме на фоне беременности. *Проблемы биологии и медицины*. 2019. № 4. С. 171–175. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

23. Яремчук О. З. Нейропротекторна роль АГ у механізмах ураження головного мозку вагітних мишей BALB/c з антифосфоліпідним синдромом. *Sciences of Europe*. 2020. № 47. С. 14–18.

24. **Яремчук О. З.**, Посохова Е. А., Кузьмак И. П. Влияние L-аргинина на содержание некоторых провоспалительных цитокинов при экспериментальном антифосфолипидном синдроме. *Проблемы биологии и медицины*. 2020. № 1.

С. 200–204. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

25. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Куліцька М. І. Вплив L-аргініну та АГ на розвиток оксидативного стресу у мозку при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. *Sciences of Europe*. 2020. № 48. С. 20–24. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено статтю до друку).*

#### **Патент України на корисну модель**

26. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Куліцька М. І., Шевчук О. О., Кузьмак І. П. Патент на корисну модель UA 142063 U. Спосіб корекції ураження нирок за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. МПК (2020.01) A61K 31/00 A61P 13/12 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) G09B 23/28 (2006.01) № u201911363; заявлено 22.11.2019; опубліковано 12.05.2020; Бюл. № 9. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, формулювання висновків, підготовку матеріалів до друку).*

#### **Тези наукових доповідей**

27. Фролов М., **Яремчук О.**, Сак І., Сампара С. Зміни параметрів зсідання крові при експериментальному гестаційному антифосфоліпідному синдромі. XVII Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених, м. Тернопіль, 22–24 квітня 2013 року: тези доповіді. Тернопіль, 2013. С. 256. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

28. Посохова К. А., **Яремчук О. З.**, Сак І. Ю., Сампара С. Р., Куліцька М. І. Дослідження деяких параметрів зсідання крові при гестаційному антифосфоліпідному синдромі. Довкілля і здоров'я: науково-практична конференція, м. Тернопіль, 25–26 квітня 2013 року: тези доповіді. Тернопіль, 2013. С. 165. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

29. Posokhova K. A., Sampara S. R., Sak I. Y., **Yaremchuk O. Z.** The effectiveness of nitric oxide precursor in experimental gestational antiphospholipid syndrome. 9<sup>th</sup> Meeting of the European Forum on Antiphospholipid Antibodies, 16–18 May 2013, Krakow, 2013. P. 61. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

30. Посохова К. А., **Яремчук О. З.**, Сак І. Ю. Вплив вагітності на рівень тромбоцитів при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Актуальні питання безпечного застосування ліків: науково-практична конференція, м. Тернопіль, 17–18 жовтня 2013 року: тези доповіді. Тернопіль, 2013. С. 60. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну*

обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).

31. Посохова К. А., **Яремчук О. З.**, Сампара С. С., Сак І. І. Роль системи оксиду азоту у патогенезі експериментального антифосфоліпідного синдрому. Актуальні питання безпечного застосування ліків: науково-практична конференція, м. Тернопіль, 17–18 жовтня 2013 року: тези доповіді. Тернопіль, 2013. С. 61–62. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

32. Посохова К. А., **Яремчук О. З.**, Сампара С. Р. Зміни деяких показників гемостазу при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: підсумкова науково-практична конференція, м. Тернопіль, 21 травня 2014 року: тези доповіді. Тернопіль, 2014. С. 130. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

33. Посохова К. А., **Яремчук О. З.**, Куліцька М. І. Вплив модуляторів синтезу оксиду азоту на показники гемостазу за умов антифосфоліпідного синдрому в експерименті. XI Український біохімічний конгрес, м. Київ, 6–10 жовтня 2014 року: тези доповіді. Український біохімічний журнал. 2014. № 86 (5) (Додаток 2). С. 27–28. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

34. Долик Н., Брик А., **Яремчук О.**, Драган Н., Фролов М. Роль прооксидантно-антиоксидантної системи в патогенезі ураження нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. XX Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 25–27 квітня 2016 року: тези доповіді. Тернопіль, 2016. С. 267. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

35. Брик А., Кузьмак І., **Яремчук О.** Вплив L-аргініну на деякі показники гемостазу та прооксидантно-антиоксидантної системи нирок при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. XXI Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 24–26 квітня 2017 року: тези доповіді. Тернопіль, 2017. С. 247–248. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

36. Брик А., **Яремчук О.** Вплив L-аргініну на показники вільнорадикального окиснення у нирках при експериментальному антифосфоліпідному синдромі. XXII Міжнародний медичний конгрес студентів та молодих вчених, м. Тернопіль, 23–25 квітня 2018 року: тези доповіді. Тернопіль, 2018. С. 255. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

37. **Яремчук О. З.**, Кузьмак І. П., Посохова К. А. Дослідження вмісту гліального фібрилярного кислого протеїну у головному мозку мишей

з експериментальним антифосфоліпідним синдромом. XII Український біохімічний конгрес, м. Тернопіль, 30 вересня – 4 жовтня 2019 року: тези доповіді. Медична та клінічна хімія. 2019. Т. 21. № 3 (додаток). С. 257–258. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

38. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А. Вплив L-аргініну та аміногуанідину на деякі показники прооксидантно-антиоксидантної системи печінки та нирок за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому. Актуальні питання фармакології та фармакотерапії: Всеукраїнська науково-практична конференція, м. Тернопіль, 26–27 вересня 2019 року: тези доповіді. Тернопіль, 2019. С. 80–81. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

39. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А. Дослідження показників системи гемостазу та цитокінового профілю при експериментальному антифосфоліпідному синдромі до вагітності та на фоні вагітності. Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині – 2020: Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю, м. Запоріжжя, 05–06 березня 2020 року: тези доповіді. Запоріжжя, 2020. С. 34. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

40. **Яремчук О. З.**, Посохова К. А., Куліцька М. І. Вплив L-аргініну на розвиток апоптозу та продукцію активних форм кисню у лейкоцитах крові при експериментальному антифосфоліпідному синдромі на фоні вагітності. Здобутки клінічної та експериментальної медицини: підсумкова LXIII науково-практична конференція, м. Тернопіль, 12 червня 2020 року: тези доповіді. Тернопіль, 2020. С. 74. *(Здобувачем особисто сплановано та проведено експеримент, статистичну обробку та аналіз отриманих результатів, сформульовано висновки, підготовлено тези до друку).*

## АНОТАЦІЯ

**Яремчук О. З. Механізми дії модулаторів системи нітроген оксиду за умов експериментального антифосфоліпідного синдрому.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук зі спеціальності 03.00.04 «Біохімія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021.

Дисертацію присвячено з'ясуванню ролі системи нітроген оксиду в розвитку антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних мишей лінії BALB/c й біохімічних механізмів дії модулаторів системи нітроген оксиду за умов ураження головного мозку, печінки і нирок при цій патології.

Встановлено, що за умов антифосфоліпідного синдрому у вагітних та невагітних тварин виникає відносна недостатність нітроген оксиду,

який синтезується під впливом ендотеліальної ізоформи NO-синтази, на фоні загального гіперпродукування нітроген оксиду, який синтезується під впливом індукцйбельної ізоформи NO-синтази, що супроводжується розвитком ендотеліальної дисфункції, активацією апоптозу та зниженням продукування активних форм оксигену в лейкоцитах крові, гіперкоагуляцією, дисбалансом про- і протизапальних цитокінів, реактивним астрогліозом, оксидативним та нітрооксидативним стресом у мозочку та півкулях великого мозку, печінці й нирках.

Встановлено, що L-аргінін за умов антифосфоліпідного синдрому зменшує прояви ендотеліальної дисфункції, гіперкоагуляції, оксидативного стресу у півкулях великого мозку, печінці й нирках, сприяє нормалізації життєздатності лейкоцитів та активних форм оксигену в гранулоцитах і агранулоцитах тварин із цією патологією на фоні активації синтезу нітроген оксиду в досліджуваних органах.

Нейропротекторний вплив інгібітора індукцйбельної ізоформи NO-синтази аміногуанідину при антифосфоліпідному синдромі проявляється зменшенням розвитку астрогліозу, оксидативного та нітрооксидативного стресу в мозочку і півкулях великого мозку.

Комбіноване застосування L-аргінину й аміногуанідину при антифосфоліпідному синдромі супроводжується нейро-, гепато- і нефропротекторною активністю, що підтверджується зменшенням вмісту аутоантитіл до протеїнів головного мозку, пригніченням розвитку реактивного астрогліозу та активацією процесів ремієлінізації у мозочку та півкулях великого мозку, зменшенням ознак оксидативного та нітрооксидативного стресу в мозочку, півкулях великого мозку, печінці й нирках. Встановлено нормалізацію рівня синтезу нітроген оксиду, кількості циркулюючих десквамованих ендотеліоцитів, показників системи гемостазу і балансу про- та протизапальних цитокінів, показників життєздатності лейкоцитів, вмісту активних форм оксигену в гранулоцитах і агранулоцитах, вмісту каспази-3 в печінці. Гепатопротекторний і нефропротекторний вплив L-аргінину й аміногуанідину при їх комбінованому застосуванні за умов антифосфоліпідного синдрому підтверджено гістологічними та субмікроскопічними дослідженнями тканин печінки і нирок.

**Ключові слова:** антифосфоліпідний синдром, нітроген оксид, ендотеліальна дисфункція, L-аргінін, аміногуанідин, гемостаз, цитокіни, нейроспецифічні протеїни, апоптоз, оксидативний стрес, мозочок, півкулі великого мозку, печінка, нирки, вагітність.

## АННОТАЦІЯ

**Яремчук О. З. Механізми действия модуляторов системы оксид азота в условиях экспериментального антифосфолипидного синдрома.** – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 03.00.04 «Биохимия». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2021.

Диссертация посвящена выяснению роли системы оксид азота в развитии антифосфолипидного синдрома у беременных и небеременных мышей линии BALB/c и биохимических механизмов протекторного действия модуляторов системы оксида азота в условиях поражения головного мозга, печени и почек при этой патологии.

Установлено, что в условиях антифосфолипидного синдрома у мышей возникает относительная недостаточность оксида азота, индуцированного эндотелиальной изоформой NO-синтазы, на фоне общего гиперпродуцирования оксид азота, который синтезируется под влиянием индуцибельной изоформы NO-синтазы. Комбинированное применение предшественника синтеза оксид азота L-аргинина и ингибитора индуцибельной изоформы NO-синтазы аминогуанидина при антифосфолипидном сопровождается нейро-, гепато- и нефропротекторной активностью, что подтверждается снижением общего содержания глиального фибриллярного кислого протеина, содержания основного протеина миелина в мозжечке и больших полушариях, уменьшением признаков оксидативного и нитрооксидативного стресса в мозжечке, больших полушариях головного мозга, печени и почках. Установлено нормализацию уровня синтеза оксида азота, количества циркулирующих десквамированных эндотелиоцитов, показателей системы гемостаза и баланса про- и противовоспалительных цитокинов, показателей жизнеспособности лейкоцитов, содержания активных форм кислорода в гранулоцитах и агранулоцитах, содержания каспазы-3 в печени. Гепатопротекторный и нефропротекторный эффект L-аргинина и аминогуанидина при их комбинированном применении в условиях антифосфолипидного синдрома подтверждено гистологическими и субмикроскопическими исследованиями тканей печени и почек.

**Ключевые слова:** антифосфолипидный синдром, оксид азота, эндотелиальная дисфункция, L-аргинин, аминогуанидин, гемостаз, цитокины, нейроспецифические протеины, апоптоз, оксидативный стресс, мозжечок, большие полушария головного мозга, печень, почки, беременность.

## ANNOTATION

**Yaremchuk O. Z. Mechanisms of Action of the Nitric Oxide System Modulators in Experimental Antiphospholipid Syndrome.** – The Manuscript.

Thesis for the scientific degree of Doctor of Biological Sciences in specialty 03.00.04 «Biochemistry». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to elucidating the role of the nitric oxide (NO) system in the non-pregnant and pregnant mice BALB/c with antiphospholipid syndrome and biochemical mechanisms of protective action of nitric oxide modulators in brain, liver and kidney in this pathology. The expediency of using the precursor of NO, L-arginine, in combination with a inhibitor of the inducible isoform of nitrogen oxide synthase, aminoguanidine, in order to correct the identified violations of the studied processes in antiphospholipid syndrome has been experimentally substantiated.

It was found that in the non-pregnant and pregnant animals with antiphospholipid syndrome there is a relative lack of NO induced by endothelial NO-synthase, against the background of general hyperproduction of NO, which is synthesized under the influence of inducible NO-synthase. The experimental antiphospholipid syndrome is accompanied by the development of endothelial dysfunction, hypercoagulation, activation of apoptosis and decreased production of reactive oxygen species in blood leukocytes, imbalance of pro- and anti-inflammatory cytokines, reactive astrogliosis, oxidative and nitrooxidative stress, and disorders of tissue respiration in the brain, liver and kidneys.

It was found that the precursor of NO, L-arginine, in the non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome promotes the activation of eNOS in the blood and liver, accompanied by increased bioavailability of NO in the cerebellum, cerebral hemispheres, liver and kidneys. It is shown that during introduction of L-arginine there is an improvement of ultrastructural disorders of the vessels of the microcirculation of the liver and normalization of the number of circulating desquamated endothelial cells. It was found that L-arginine under the conditions of APS reduces the appearances of hypercoagulation, helps to normalize the viability of leukocytes and reactive oxygen species in granulocytes and agranulocytes, and reduces the content of caspase-3 and  $\beta$ -actin in the liver. The effect of L-arginine on the development of oxidative stress in the non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome is accompanied by inhibition of the activity of membrane lipid peroxidation in the cerebral hemispheres, liver, kidneys; activation of the antioxidant defense system in the cerebral hemispheres, liver, kidneys; normalization of energy supply processes in the liver and kidneys. The effect of L-arginine on the state of the structures of the central nervous system (cerebellum and cerebral hemispheres) in experimental antiphospholipid syndrome before pregnancy and during pregnancy is accompanied by inhibition of reactive astrogliosis, activation of remyelination processes. L-arginine under the conditions of APS exhibits antioxidant, hepato- and nephroprotective properties.

Inhibitor of inducible NO synthase, aminoguanidine, helps to reduce the concentration of iNOS in serum and liver and the content of stable metabolites of NO in serum and tested organs (cerebellum, cerebral hemispheres, liver, kidneys) of the non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome; does not cause significant changes in the number of circulating desquamated endothelial cells; causes the progression of pathological changes in the coagulogram, which indicates an increase in the tendency to thrombosis. In the liver and kidneys of mice with APS, aminoguanidine causes further intensification of free radical oxidation, which is combined with the activation of anti-radical and antioxidant protection. Aminoguanidine in the non-pregnant and pregnant animals with antiphospholipid syndrome helps to reduce the total content of glial fibrillary acidic protein in the cerebellum and cerebral hemispheres. Administration of aminoguanidine does not affect the content of the myelin basic protein in the cerebellum and cerebral hemispheres of the brain of non-pregnant mice with APS. Introduction of aminoguanidine in animals with APS on the 18th day of pregnancy caused the decrease in the content of the myelin basic protein in the cerebellum.

Aminoguanidine, in the case of its separate administration, helps to reduce the content of antibodies to the brain's own proteins in the non-pregnant and pregnant mice with antiphospholipid syndrome. The neuroprotective effect of aminoguanidine in APS is manifested by a decrease in oxidative stress in the cerebellum and cerebral hemispheres.

During combined use of the NO precursor, L-arginine, and inhibitor of the inducible NOS, aminoguanidine, in the non-pregnant and pregnant mice BALB/c with antiphospholipid syndrome, there is a preservation of the positive effect of L-arginine and also its enhancement, which is manifested by neuroprotective, hepatoprotective and nephroprotective effects and is confirmed by a decrease in signs of oxidative and nitrooxidative stress in the cerebellum, cerebral hemispheres, liver and kidneys. There is a normalization of NO synthesis, normalization of the number of circulating desquamated endothelial cells, improved hemostasis and balance of pro- and anti-inflammatory cytokines, improved leukocyte viability, oxygen content in granulocytes and agranulocytes, stabilized caspase-3 level in the liver. The neuroprotective effect of the combination of L-arginine and aminoguanidine is also evidenced by the decrease in the total content of glial fibrillary acidic protein content of the basic protein of myelin in the studied structures of the central nervous system. Hepatoprotective and nephroprotective effects of L-arginine and aminoguanidine in their combined use under APS conditions were confirmed by histological and submicroscopic studies of liver and kidney tissue.

**Key words:** antiphospholipid syndrome, nitric oxide, endothelial dysfunction, L-arginine, aminoguanidine, hemostasis, cytokines, neurospecific proteins, apoptosis, oxidative stress, cerebellum, cerebral hemispheres, liver, kidney, pregnancy.



**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

АФС – антифосфоліпідний синдром;  
АЧТЧ – активований частковий тромбопластиновий час;  
ГПЛ – гідропероксидази ліпідів;  
КАТ – каталаза;  
СДГ – сукцинатдегідрогеназа;  
СОД – супероксиддисмутаза;  
ТБК-АП – продукти реакції з тіобарбітуровою кислотою;  
ЦХО – цитохромоксидаза;  
AG – аміногуанідин;  
GFAP – гліальний фібрилярний кислий протеїн;  
G-SH – відновлений глутатіон;  
IL-1 $\beta$  – інтерлейкін-1 $\beta$ ;  
IL-4 – інтерлейкін-4;  
IL-6 – інтерлейкін-6;  
IL-10 – інтерлейкін-10;  
L-Arg – L-аргінін;  
MBP – основний протеїн мієліну;  
NO – нітроген оксид;  
NO<sub>2</sub><sup>-</sup> – нітрит-аніон;  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> – нітрат-аніон;  
eNOS – ендотеліальна ізоформа синтази нітроген оксиду;  
iNOS – індукцйбельна ізоформа синтази нітроген оксиду;  
TNF- $\alpha$  – фактор- $\alpha$  некрозу пухлин;  
DCF – 2',7'-дихлорофлуоресцеїн діацетату флуоресценція.